

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Artur Sergunin

**Nový potenciální zástupce eukaryotických
hemových senzorových proteinů, protein p53**

A new potential representative of eukaryotic heme sensor proteins,
the p53 protein

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání akademického titulu.

V Praze dne 11. června 2020

.....

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce doc. RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D. nejen za poskytnutí možnosti zpracovávat závěrečnou práci na takto zajímavé téma, ale také za její podporu a trpělivost při jejím zpracovávání. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Alžbětě Lengálové a Mgr. Jakubovi Vávrovi za jejich cenné rady a pomoc především při řešení experimentální části této závěrečné práce. V neposlední řadě, děkuji své rodině a kamarádům za neustálou podporu v průběhu celého studia.

Abstrakt

Hemové sensorové proteiny představují významnou skupinu hemoproteinů. Vzhledem k tomu, že jsou zodpovědné za regulaci celé řady fyziologických, ale i patologických procesů, představují významný terapeutický cíl. Nicméně aby bylo možno ovlivnit sensorové funkce těchto proteinů, je nejdříve důležité plně porozumět mechanismu jejich působení. Navíc, se tato skupina hemoproteinů neustále rozrůstá tak, jak jsou identifikováni noví zástupci hemových sensorových proteinů. V tomto ohledu se předkládaná bakalářská práce zaměřuje na eukaryotický protein p53, o kterém se spekuluje jako o novém členu skupiny hemových sensorů. S cílem detailně studovat interakci proteinu p53 s hemem za různých podmínek, jsme připravili plazmid vhodný pro heterologní expresi proteinu p53 v buňkách *E. coli*, protein byl poté exprimován a izolován. Navíc byla jak exprese proteinu, tak jeho izolace pilotně optimalizována. Výsledkem je preparát proteinu p53, využitelný pro další detailnější studie.

Klíčová slova: hem, hemové sensorové proteiny, přenos signálu, protein p53

Abstract

Heme sensor proteins represent a significant group of hemeproteins. Given that they are responsible for the regulation of various physiological and pathological processes, they represent a major therapeutic target. However, to be able to alter the sensor functions of these proteins, it is first essential to understand their regulatory mechanism. Furthermore, this group is steadily growing as new heme sensor proteins are identified. In this regard, the bachelor thesis focuses on eukaryotic p53 protein which is speculated to be a novel member of the heme sensor proteins family. For a detailed study of the interaction between p53 protein and heme under various conditions, we have prepared a plasmid suitable for heterologous expression of p53 protein in *E. coli* cells, the protein was subsequently expressed and isolated. Moreover, its expression, as well as isolation, was preliminarily optimized. As a result, a sample of p53 protein was acquired which can be used for the following more in-depth studies.

Key words: heme, heme sensor proteins, signal transduction, p53 protein

(In Czech)

Obsah

Seznam použitých zkratk	3
1 Úvod	8
1.1 Hemoproteiny	8
1.2 Hemové senzorové proteiny	11
1.3 Hemové senzorové proteiny detekující plyny	11
1.3.1 Hemové senzory kyslíku	12
1.3.2 Hemové senzory oxidu uhelnatého a oxidu dusnatého	14
1.4 Senzorové proteiny detekující hem	14
1.4.1 Inhibitor proteosyntézy regulovaný hemem (HRI)	18
1.4.2 Bach1	19
1.4.3 Neuronální PAS-doménový protein 2 (NPAS2)	21
1.5 Protein p53	22
1.5.1 Strukturní charakteristiky proteinu p53	23
1.5.2 Hlavní funkce a regulace aktivity proteinu p53	25
1.5.3 Interakce proteinu p53 s hemem a významnými senzorovými proteiny	27
2 Cíle bakalářské práce	31
3 Materiál a metody	32
3.1 Použité přístroje	32
3.2 Použitý materiál a chemikálie	34
3.3 Použité metody	38
3.3.1 Příprava agarových ploten	38
3.3.2 Očkování bakteriální kultury	38
3.3.3 Izolace plazmidové DNA	39
3.3.4 Příprava plazmidu pET-21c(+)/p53-Histag	40
3.3.5 Horizontální elektroforéza na agarosovém gelu	42
3.3.6 Transformace buněk <i>E. coli</i> BL-21(DE3) a <i>E. coli</i> DH5α	43
3.3.7 Exprese proteinu p53 v buňkách <i>E. coli</i> BL-21(DE3)	44

3.3.8	Izolace proteinu p53 z buněk <i>E. coli</i> BL-21(DE3)	45
3.3.9	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti do- decylsíranu sodného (SDS-PAGE)	47
3.3.10	Spektrofotometrické stanovení koncentrace plazmidové DNA a proteinu	50
4	Výsledky	51
4.1	Příprava plazmidu pET-21c(+)/p53-Histag	51
4.2	Expres proteinu p53 a optimalizace tohoto procesu	54
4.3	Izolace proteinu p53 v jeho „apoformě“	54
4.4	Základní charakterizace proteinu p53	59
5	Diskuze	61
6	Závěr	67
	Seznam použitých zdrojů	68

Seznam použitých zkratk

<i>AfGcHK</i>	histidinkinasa s globinovou strukturou senzorové domény z bakterie <i>Anaeromyxobacter sp.</i> , kmen Fw 109-5
APAF1	apoptotický faktor 1 aktivující proteasu
APS	peroxosíran amonný
ARF	tumor supresorový protein působící jako přímý inhibitor MDM2, z anglického „alternate reading frame“
Bach1	transkripční faktor genů buněčného cyklu, jeho název je akronymem odvozeným z názvu jeho důležité domény (BTB) a skupiny transkripčních faktorů, do které patří (CNC), tj. BTB a CNC homolog 1
BAX	protein regulující proces apoptózy, z anglického „Bcl-2-associated X protein“
BMAL1	interakční partner NPAS2, z anglického „brain and muscle Arnt-like protein 1“
bp	pár bází, z anglického „base pair“
BTB	doména Bach1 sloužící k jeho oligomerizaci s dalšími proteiny, z anglického „Broad-Complex, Tramtrack and Bric a brac“
bZIP	doména bazických leucinových zipů proteinu Bach1
c-di-GMP	cyklický diguanosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CNC	označení pro skupinu transkripčních faktorů, z anglického „Cap'n'collar“
CP	strukturní motiv v proteinech, který je dvěma tvořen za sebou jdoucími zbytky cysteinu a prolinu, v tomto pořadí

Crm1	protein zprostředkovávající jaderný export, z anglického „chromosomal region maintenance 1“
CRY	protein z rodiny Cryptochrome
CRY1	protein Cryptochrome 1
CTD	C-terminální doména ve struktuře proteinu p53
DBD	DNA-vazebná doména ve struktuře proteinu p53, z anglického „DNA-binding domain“
DDB2	protein účastnící se excizních oprav nukleotidů, z anglického „DNA damage-binding protein 2“
DISC	komplex tvořený proteiny Fas a FADD, z anglického „death-inducing signaling complex“
DR5	receptor z rodiny TNF, z anglického „death receptor 5“
DREAM	represor transkripce genů podílejících se na regulaci buněčného cyklu, z anglického „dimerization partner, R B-like, E 2F and m ulti-vulval class“
E2F1	transkripční faktor regulující průběh buněčného cyklu
<i>Ec</i> DOS	hemový senzorový protein exprimovaný bakterií <i>E. coli</i> , detekuje kyslík, z anglického „ <i>E. coli</i> “ direct oxygen sensor
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
eIF2	eukaryotický iniciační faktor 2
eIF2 α	α podjednotka eukaryotického iniciačního faktoru 2
eIF2B	eukaryotický iniciační faktor 2B
FADD	adaptorový protein zprostředkovávající přenos signálu mezi receptory z rodiny TNF a kaspasou 8, z anglického „Fas associated death domain“

Fas	receptor z rodiny TNF
FasL	ligand proteinu Fas
FixJ	interakční partner senzorového proteinu FixL
FixL	hemový senzor kyslíku s kinasovou aktivitou, podílí se na regulaci exprese proteinů účastnících se fixace vzdušného dusíku
GAF	strukturní motiv senzorové domény, akronym odvozený z názvů proteinů, ve kterých byl prvně objeven, tj. „cGMP-dependent phosphodiesterase“, „ <i>Anabaena</i> adenyl cyclase“ a „ <i>E. coli</i> formate hydrogenlyase transcriptional activator“
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
HFE	membránový protein regulující distribuci železa v organismu, z anglického „high Fe(II)“
HO-1	hemoxygenasa-1
HRI	inhibitor proteosyntézy regulovaný hemem, z anglického „heme-regulated inhibitor“
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
LB	Luria-Bertani
MDM2	ubikvitin ligasa řídící proteazomální degradaci proteinu p53, z anglického „mouse double minute homolog 2“
MDM4	interakční partner proteinu MDM2, z anglického „mouse double minute homolog 4“
Met-tRNA _i	methionin transferová RNA
mRNA	mediátorová RNA
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukována forma)

NES	jaderný exportní signál, z anglického „nuclear export signal“
NOXA	protein regulující proces apoptózy, z latinského „noxa“, tj. poškození
NPAS2	neuronální PAS-doménový protein 2
OD	oligomerizační doména ve struktuře proteinu p53
OD ₆₀₀	hodnota optické denzity při vlnové délce 600 nm
p21	inhibitor cyklin-dependentních kinas
p53	transkripční faktor s tumor supresorovou aktivitou
p63	protein patřící do rodiny p53, účastní se především regulace embryogeneze a diferenciac buněk
p73	protein patřící do rodiny p53, účastní se především regulace embryogeneze a diferenciac buněk
PAS	strukturní motiv senzorové domény, akronym odvozený z názvů proteinů, ve kterých byl prvně objeven, tj. „ <i>Drosophila</i> p eriod clock protein“, „vertebrate a ryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ a „ <i>Drosophila</i> s ingle-minded protein“
PCR	polymerasová řetězová reakce, z anglického „polymerase chain reaction“
PER	protein z rodiny Period
PER1	protein Period 1
PER2	protein Period 2
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
PRR	region bohatý na prolin ve struktuře proteinu p53, z anglického „proline-rich region“
PUMA	protein regulující proces apoptózy, z anglického „p53 upregulated modulator of apoptosis“

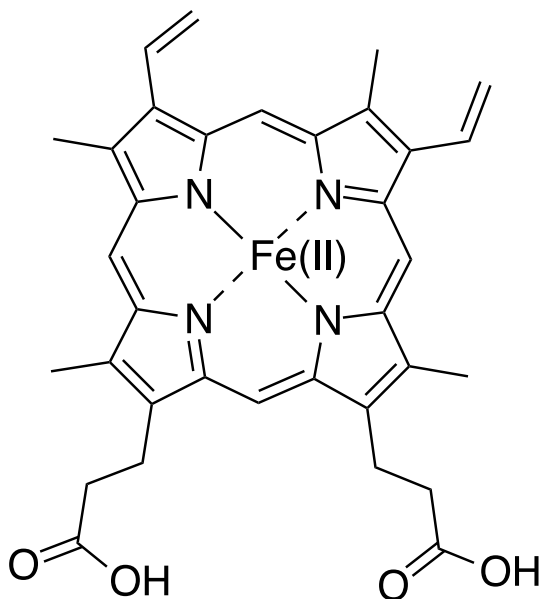
SDS	dodecylsíran sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
sGC	hemový senzor oxidu dusnatého s guanylátcyklasovou aktivitou, z anglického „soluble guanylate cyclase“
SV40	opičí virus 40, z anglického „simian virus 40“
TAD1	transaktivační doména 1 ve struktuře proteinu p53
TAD2	transaktivační doména 2 ve struktuře proteinu p53
TAE	Tris-acetát-EDTA
TB	Terrific Broth
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TIGAR	enzym regulující rozklad glukosy, z anglického „TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator“
TNF	tumor nekrotický faktor
<i>TP53</i>	gen kódující protein p53
TRAIL	ligand receptoru DR5, z anglického „TNF-related apoptosis-inducing ligand“
Tris	tris(hydroxymethyl)aminoethan
XPC	protein účastnící se excizních oprav nukleotidů, z anglického „ <i>Xeroderma pigmentosum</i> group C-complementing protein“
YddV	diguanylátcyklasa s globinovou doménou

1 Úvod

Hemové sensorové proteiny ovlivňují celou řadu různých fyziologických i patologických procesů probíhajících jak v prokaryotických, tak v eukaryotických organismech. Regulace aktivity těchto proteinů představuje potenciální cíl terapeutického zákroku. Abychom však mohli uvažovat o zásahu do kaskády dějů, kterou tyto proteiny řídí, musíme nejprve pochopit mechanismus jejich působení. Laboratoř hemových sensorových proteinů má bohaté zkušenosti s přípravou a studiem prokaryotických hemových sensorových proteinů, nicméně velká pozornost je věnována také eukaryotickým sensorům. Tato bakalářská práce si vzala za cíl připravit eukaryotický protein, konkrétně protein p53, o němž se nově uvažuje také jako o hemovém sensorovém proteinu [1]. Tento nově zvolený systém má potenciál obohatit naše znalosti v rámci studia molekulárního mechanismu hemových sensorových proteinů.

1.1 Hemoproteiny

Hemoproteiny jsou skupinou proteinů, jejichž prostetickou skupinou je molekula hemu [2]. Hem je esenciální molekula, která se účastní řady biochemických procesů, v přírodě lze nalézt několik různých typů hemů, které jsou biologicky aktivní. Nejběžnějším typem je hem *b*, základem jeho struktury je molekula porfinu. Porfin je tvořen čtyřmi pyrrolovými heterocykly spojenými v α -polohách methinovými můstky a je základní kostrou všech porfyrinů [3, 4]. Porfin nemá žádné další substituenty a v přírodě se jako takový nevyskytuje. Substitucí porfinu v β -polohách pyrrolových kruhů získáváme strukturu zvanou porfyrin [5]. V případě hemu *b* se v centru porfyrinového skeletu nachází iont železa a jeho β -polohy jsou substituovány čtyřmi methylovými, dvěma vinylovými a dvěma propionátovými skupinami (viz Obrázek 1, strana 9) [3].



Obrázek 1. Struktura hemu *b*.

U hemoproteinů se setkáváme nejen s hemem *b*, ale i s dalšími typy, které se mohou lišit svojí strukturou a funkcí. Hem *c* má strukturu podobnou hemu *b*, ale porfyrinový cyklus je v tomto případě kovalentně navázán na cysteinové zbytky polypeptidového řetězce, tento typ hemu se nachází například v cytochromu *c* [6]. Hem *a* je prostetickou skupinou cytochromu *a*, opět se jedná o derivát hemu *b*, jehož methylová skupina nacházející se v poloze 8 je nahrazena formylovou skupinou a vinylová skupina v poloze 2 je nahrazena hydroxyethylfarnesylovou skupinou. Tato strukturní změna ovlivňuje redoxní, spektrální a vazebné vlastnosti hemu *a* [7]. Přestože hem plní řadu klíčových funkcí v buňce, tak při vysokých koncentracích se stává cytotoxickým kvůli své hydrofobitě a schopnosti katalyzovat tvorbu reaktivních forem kyslíku. Syntéza, degradace a transport hemu uvnitř buněk musí být proto přísně regulovány [8, 9].

Centrální iont železa je v hemu vždy koordinován čtyřmi ekvatoriálními ligandy, jimiž jsou atomy dusíku pyrrolových heterocyklů, zbylé dvě axiální polohy mohou být obsazeny dalšími ligandy [10]. Hemová skupina je obvykle zakotvena v hydrofobním jádře proteinu a k interakci mezi hemem a proteinem dochází nejčastěji přes axiální vazbu centrálního iontu železa a postranního řetězce aminokyselin. Ve většině hemoproteinů k této interakci dochází prostřednictvím histidinových zbytků, hem může ovšem interagovat i s postranními řetězci cysteinu, methioninu nebo tyrosinu. Ami-

nokyseliny nacházející se v blízkém okolí hemu mají vliv na specifitu jeho interakce s dalším ligandem [11].

Rozmanitost biologických funkcí hemoproteinů pochází z rozdílných interakcí mezi polypeptidovým řetězcem a prostetickou skupinou hemu. V případě přenašečů elektronů jako cytochrom b_5 a cytochrom c nacházíme zpravidla hexakoordinovaný iont železa hemové skupiny (v obou axiálních polohách je koordinován aminokyselinovými zbytky). V myoglobinu, přenašeči kyslíku, se nachází pentakoordinovaný iont železa s přístupným vazebným místem pro molekulu kyslíku [12].

Příroda využívá hemoproteinů k vykonávání řady biologických procesů, hemoproteiny lze rozdělit podle funkce, kterou zastupují, do čtyř skupin. První skupinou jsou hemoproteiny, jejichž úlohou je především přenos a skladování kyslíku. Tyto funkce v organismech obratlovců plní globulárními proteiny hemoglobin a myoglobin. V závislosti na účinnosti transportu kyslíku je potom ovlivněna celá řada fyziologických funkcí [13]. Centrální iont železa je v těchto proteinech koordinován axiální vazbou k histidinu polypeptidového řetězce a z druhé strany je umožněno navázání molekuly kyslíku. Reverzibilní a selektivní vazba ligandů je zprostředkována samotnou globulinovou strukturou proteinu [10].

Druhou skupinou jsou hemoproteiny podílející se na přenosu elektronů, patří sem zejména cytochromy, které se účastní reakcí dýchacího řetězce. Tyto proteiny přenášejí elektrony od nižšího k vyššímu redoxnímu potenciálu. Ve výsledku dochází k přenosu čtyř elektronů z cytochromu c na cytochromoxidasu za současné redukce molekuly kyslíku na molekulu vody. Tento proces umožňuje právě prostetická skupina hemu, konkrétně centrální iont železa, který je schopen přecházet mezi svým oxidovaným a redukováným stavem [14].

Třetí skupinou jsou hemoproteiny s katalytickou aktivitou. Mikrosomální enzymové komplexy jsou potřeba k zajištění správného průběhu mnoha metabolických drah včetně biotransformace xenobiotik. Řadu takových reakcí zprostředkovává hemový enzym cytochrom P450 [15]. Hem se také nachází v aktivním centru peroxidasy. Reaguje tam s peroxidem vodíku za vzniku vysoce reaktivních intermediátů, které mohou oxidovat další jednoduché látky [16].

Kromě těchto zmíněných a poměrně známých funkcí hemoproteinů se v poslední době začíná zkoumat vlastnost hemoproteinů jako přenašečů signálu. Hemoproteiny

jsou schopné reagovat na přítomnost diatomických molekul plynů jako kyslík, oxid uhelnatý nebo oxid dusnatý a následně vyvolávají buněčnou odpověď v závislosti na intracelulární koncentraci těchto částic [17]. Některé proteiny naopak mohou detekovat přítomnost či nepřítomnost hemu, na základě čehož následuje specifická odezva [18]. Tato čtvrtá skupina se souhrnně označuje jako hemové senzorové proteiny.

1.2 Hemové senzorové proteiny

Během posledních dvaceti let byla objevena celá řada hemových senzorových proteinů [19]. Na základě toho, která molekula působí jako signální, rozlišujeme dva typy těchto senzorů. Obsahuje-li daný protein prostetickou skupinu hemu, která slouží jako koordinační centrum pro molekuly plynu, pak je označujeme jako hemové senzorové proteiny detekující plyny. Pokud ovšem protein reaguje na navázání nebo odštěpení samotné molekuly hemu, tak je označujeme jako senzorové proteiny detekující hem [18].

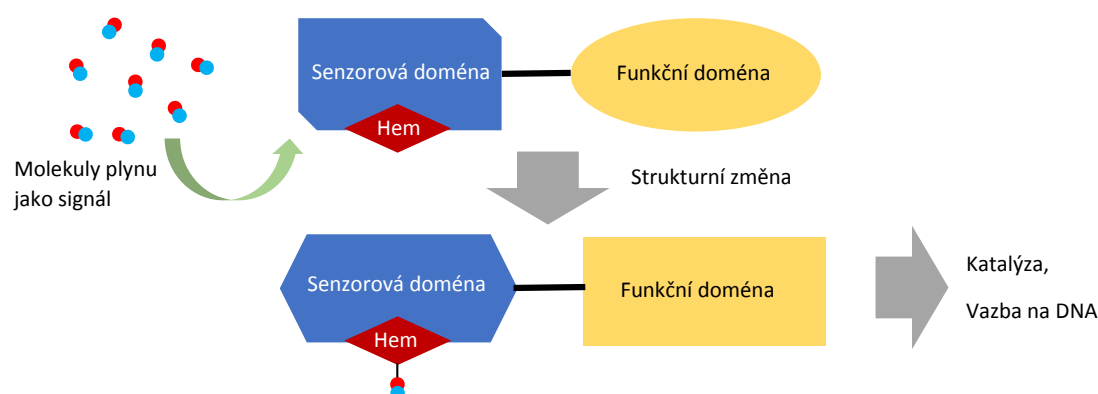
Tyto biologické senzory jsou tvořeny přinejmenším dvěma odlišnými doménami. Jedna doména je senzorová a nachází se tam vazebné místo pro molekulu hemu nebo již hem obsahuje a reaguje na přítomnost diatomických molekul plynů. Druhá doména je funkční a zodpovídá za vytvoření biologické odezvy [19]. Počáteční signál na úrovni hemu je na základě strukturní změny proteinu přenesen na funkční doménu, jež zprostředkovává následnou katalytickou činnost, vazbu na DNA, nebo genovou expresi [20, 21].

1.3 Hemové senzorové proteiny detekující plyny

Tato skupina hemových proteinů reaguje na přítomnost malých diatomických molekul plynů, přičemž doposud byly popsány senzory kyslíku, oxidu uhelnatého a oxidu dusnatého. Odezvy vytvořené jejich funkční doménou jsou ovšem poměrně rozmanité, může se jednat o kinasovou aktivitu, tvorbu či rozklad cyklického diguanosinmonofosfátu (c-di-GMP) nebo regulaci aktivace transkripce DNA. Ať už přímo, nebo přes kaskádu navazujících kroků, tyto senzory ve výsledku ovlivní určitou fyziologickou funkci v závislosti na vnějším podnětu [20].

Senzorové proteiny fungují na principu spínače, kdy navázání či odštěpení molekuly plynu převede funkční doménu proteinu do aktivního nebo naopak neaktivního stavu [22]. Přechod z jednoho stavu do druhého je iniciován navázáním nebo odštěpením molekuly plynu od hemu (viz Obrázek 2). Jedná se o biochemický děj, ke kterému dochází v řádu desítek femtosekund. V důsledku vede k přeuspořádání hemového okolí uvnitř sensorové domény proteinu a to se dále přenáší až do funkční domény, přičemž k počáteční strukturní změně dochází přibližně v řádu pikosekund. Tato změna je potom stěžejní pro následující signální kroky, které se uskutečňují v delším časovém měřítku [20].

Prostetická skupina hemu se zpravidla vyskytuje v oblasti N-konce polypeptidového řetězce, zatímco na C-konci se nachází funkční doména [22, 23]. Existují ovšem i výjimky, kdy je sensorová doména lokalizována mezi N- a C-koncem polypeptidu [24].



Obrázek 2. Mechanismus regulace hemových sensorových proteinů detekujících plyny. Hem, již vázaný na sensorovou doménu proteinu, detekuje přítomnost diatomické molekuly plynu (primární signál). Vazba molekuly plynu na hem vyvolává strukturní změnu nejprve v oblasti sensorové domény (sekundární signál a posléze se projeví i na funkční doméně. Funkční doména v tuto chvíli změní svoji aktivitu a zahájí vyvolání specifické buněčné odpovědi. Převzato a upraveno dle [21].

1.3.1 Hemové senzory kyslíku

V případě hemových sensorových proteinů kyslíku se setkáváme s několika druhy sensorových domén, a to PAS, GAF a globinovou doménou [25]. PAS je akronym odvozený z názvů proteinů, ve kterých byl tento sensorový motiv objeven. Jedná se

o proteiny „*Drosophila* period clock protein“, „vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ a „*Drosophila* single-minded protein“. [26]. PAS doména je složena z pěti či šesti antiparalelních β -struktur a křížící je α -helixy utváří prostor pro vazbu molekuly hemu [27, 28]. Výskyt této domény není ovšem omezen pouze na senzory kyslíku, setkáváme se s ní i u senzorů oxidu uhelnatého a oxidu dusnatého [29]. Akronym GAF je odvozen z názvů proteinů, ve kterých byl tento strukturní motiv poprvé popsán, konkrétně „cGMP-dependent phosphodiesterase“, „*Anabaena* adenyl cyclase“ a „*E. coli* formate hydrogenlyase transcriptional activator“. GAF doména má podobnou strukturu jako PAS doména. Pět antiparalelních β -struktur obklopených čtyřmi α -helixy utváří prostor pro vazbu mnoha různých organických molekul jako flavin, adenin, cyklický guanosinmonofosfát nebo hem. Přestože je GAF doména strukturně podobná PAS doméně, tak je způsob interakce s hemem v GAF doméně odlišný [22]. V případě globinových sensorových domén lze pozorovat strukturní homologii s mnoha dalšími globinovými proteiny jako jsou savčí myoglobin a hemoglobin. Jsou také složeny z několika α -helixů, avšak na rozdíl od hemoglobinu či myoglobinu postrádají D helix a část E helixu [25, 30].

Příkladem hemoproteinu s PAS sensorovou doménou je FixL. Je to protein s kinasovou aktivitou, který reguluje expresi genů pro proteiny účastnící se fixace dusíku u bakterií rodu *Rhizobium*. Kinasová aktivita tohoto proteinu je potlačena vazbou kyslíku na molekulu hemu [22, 29]. Absence kyslíku naopak katalyzuje fosforylaci transkripčního faktoru FixJ, čímž se spouští genová exprese [20]. Dalším významným senzorem, obsahujícím PAS sensorovou doménu, je senzor kyslíku exprimovaný bakterií *Escherichia coli* (*EcDOS*, z anglického „*E. coli* direct oxygen sensor“). Jedná se o hemoprotein s fosfodiesterasovou aktivitou, katalyzuje přeměnu c-di-GMP na lineární diguanosinmonofosfát [28]. Alternativním substrátem pro *EcDOS* může také být cyklický adenosinmonofosfát, fosfodiesterasová aktivita je však pro tento substrát podstatně nižší než pro c-di-GMP [22]. Katalytická aktivita *EcDOS* se významně zvyšuje, pokud se centrální iont železa nachází v oxidačním stavu Fe(II), než když je ve stavu Fe(III) a ještě výrazně více, pokud iont železa ve stavu Fe(II) koordinuje s oxid uhelnatý nebo kyslík [31].

Diguanylátcyklasa s globinovou sensorovou doménou (YddV) se společně se zmíněným senzorem *EcDOS* podílí na homeostáze c-di-GMP v bakterii *E. coli* [32].

Zatímco *EcDOS* katalyzuje hydrolytické štěpení c-di-GMP, tak YddV, po vazbě molekuly kyslíku na iont železa hemu, katalyzuje syntézu c-di-GMP z guanosintrifosfátu (GTP) [22, 31].

1.3.2 Hemové senzory oxidu uhelnatého a oxidu dusnatého

Příkladem senzoru oxidu uhelnatého je savčí cystathionin β -synthasa. Je to hemový enzym, který katalyzuje syntézu cystathioninu ze serinu a homocysteinu. Hemová skupina se ovšem katalýzy přímo neúčastní, cystathionin β -synthasa produkovaná prvky nebo kvasinkami například hem zcela postrádá [33]. Enzymová aktivita je regulována oxidačním stavem iontu železa v molekule hemu a vazbou oxidu uhelnatého (nebo oxidu dusnatého). Při vazbě oxidu uhelnatého na iont železa v oxidačním stavu Fe(II) dochází k inhibici katalytické aktivity [22]. Pokud se ovšem iont železa nachází ve stavu Fe(III), je enzym aktivní a jeho aktivita je přibližně dvojnásobná v porovnání s jeho redukovanou formou [33]. Vrozený deficit cystathionin β -synthasy způsobuje nemoc známou jako homocystinurie, při níž dochází k akumulaci toxického homocysteinu v organismu člověka [34].

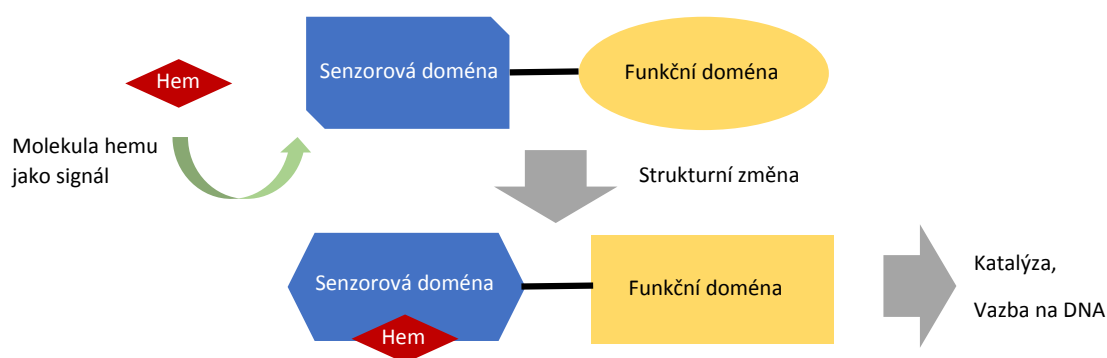
Nejprozkoumanějším senzorem oxidu dusnatého je heterodimerní protein sGC, jehož funkční doména zodpovídá za syntézu důležitého druhého posla cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP). Molekula cGMP je nezbytná pro regulaci řady fyziologických funkcí jako diferenciaci buněk, vazodilatace či agregace krevních destiček [22, 35]. sGC se skládá ze dvou podjednotek označovaných $\alpha 1$ a $\beta 1$. Pouze $\beta 1$ podjednotka obsahuje prostetickou skupinu hemu ve své N-koncové doméně. Funkční C-koncové domény obou podjednotek utvářejí společné katalytické centrum, do kterého se váže molekula GTP, z níž je syntetizováno cGMP [36]. sGC hraje klíčovou roli v regulaci aktivity kardiovaskulární soustavy a řada nemocí s ní spojených může být důsledkem nesprávné funkce sGC [35].

1.4 Senzorové proteiny detekující hem

Hem nemusí ovšem sloužit jen jako pevně vázaná prostetická skupina, existují proteiny, ve kterých působí hem jako signální molekula. Její navázání či odštěpení reguluje celou řadu fyziologických funkcí jako transkripce, translace, proteolýza,

kinasová aktivita a další. Tyto proteiny se označují jako senzorové proteiny detekující hem nebo senzory hemu [18, 37].

Senzorové proteiny detekující hem jsou tvořeny nejméně dvěma doménami. Jedna doména slouží k detekci a navázání hemu a označuje se jako senzorová. Druhá doména je funkční a zprostředkovává katalytickou aktivitu, nebo ovlivňuje vazbu daného proteinu na DNA. Jakmile je hem navázán na senzorovou doménu, tak dochází k pozměnění struktury proteinu v okolí vazebného místa. Tato strukturní změna následně ovlivní činnost funkční domény. V závislosti na přítomnosti hemu v okolí těchto proteinů tak dochází buď k zesílení, nebo inhibici jejich působení (viz Obrázek 3) [37].



Obrázek 3. Mechanismus regulace senzorových proteinů detekujících hem. Molekula hemu se váže na senzorovou doménu proteinu. Vazba hemu (primární signál) ovlivní strukturu senzorové domény. Tato strukturní změna (sekundární signál) se propaguje na funkční doménu, čímž je ovlivněna její činnost. Převzato a upraveno dle [21].

Vazebné místo pro molekulu hemu v hemových senzorech obvykle obsahuje ve své struktuře thiolátovou skupinu cysteinu. Vazba mezi thiolátem a trojmocným iontem železa hemu je podstatně slabší než koordinace pomocí imidazolového zbytku histidinu [38]. Díky této skutečnosti se může molekula hemu snadno odštěpit z vazebného místa. Disociační rychlostní konstanta hemu je u těchto proteinů poměrně vysoká. V porovnání s klasickými hemoproteiny jako hemoglobin nebo myoglobin je až o tři řády vyšší. Nicméně, jejich asociační rychlostní konstanta hemu je srovnatelná s hemoglobinem či myoglobinem, tudíž ve výsledku jsou rovnovážné disociační konstanty senzorů hemu podstatně vyšší. Tato pohotová disociace je důležitá pro správné fungování hemových senzorů. Vznik pevné vazby je nežádoucí, protože hem,

v případě těchto proteinů, působí jako primární signál. Jeho navázání spouští kaskádu dalších reakcí, po jejichž skončení je vhodné, aby daný protein měl volné vazebné místo pro hem a mohl opět působit jako hemový senzor [37].

Jedním z klíčových strukturních motivů, které se vyskytují v senzorech hemu je motiv dvou za sebou jdoucích aminokyselinových zbytků cysteinu a prolinu, v tomto pořadí (CP motiv). Thiolátová skupina cysteinu zde funguje jako vazebné místo. Prolin v bezprostřední blízkosti vazebného místa pro hem, tj. cysteinu, reguluje jeho vazebné vlastnosti.

Ačkoli CP motiv představuje nejčastější vazebné místo pro hem v hemových senzorech (někdy dokonce nazývané hemový regulační motiv), některé hemové senzory využívají samostatného cysteinového zbytku jako vazebné místo pro molekulu hemu. Tento motiv se vyskytuje například v neuronálním PAS-doménovém proteinu (viz kapitola 1.4.3). Některé proteiny jsou dokonce schopné detekce hemu zcela bez použití thiolátové skupiny. Histidinový zbytek nebo zbytky aminokyselin, jiných než cystein, mohou také fungovat jako vazebné místo pro hem [18]. Mnoho senzorů hemu obsahuje ve své struktuře více CP motivů, avšak hem se váže jen na některé z nich [37]. Jiné naopak mohou obsahovat CP motiv, který ale neslouží k detekci hemu. Přítomnost CP motivu tedy ještě neznamená, že daný protein bude nutně senzorem hemu [18].

Další důležitou vlastností hemových sensorových proteinů je to, že síla vazby hem-thiolát je také ovlivněna oxidačním stavem centrálního iontu železa. Záporně nabitá thiolátová skupina se bude lépe vázat ke kladněji nabitému centrálnímu iontu ve stavu Fe(III). Dochází-li k jeho redukci na Fe(II), tak elektrostatická interakce mezi těmito opačně nabitými ionty zeslábne. Dokonce v některých proteinech můžeme pozorovat, že původní axiální ligand, jímž byla thiolátová skupina cysteinu, se odštěpí od Fe(II) a nastane jeho záměna za imidazolovou skupinu histidinu, neutrální thiol (protonovaný cysteinový zbytek) nebo jiný aminokyselinový zbytek. Pro takové proteiny se používá označení hemové redoxní senzory. Je však vhodné poznamenat, že k této záměně axiálních ligandů nedochází u jiných hemoproteinů obsahujících centrální iont Fe(III) vázaný na thiolátovou skupinu. Jedná se konkrétně o hemové enzymy cytochrom P450 a NO-synthasa, u kterých i v případě redukce centrálního iontu na Fe(II) zůstává v pozici axiálního ligandu thiolátová skupina cysteinu. Důvo-

dem je stabilizace této interakce pomocí vodíkových vazeb sousedních aminokyselin, které neumožňují záporně nabitě thiolátové skupině disociovat pryč [18].

Nově se také ukazuje, že některé senzory hemu mohou být za určitých podmínek schopné detekce plynů. K tomuto jevu může dojít především při redukci centrálního iontu z Fe(III) na Fe(II), na nějž se mohou lépe vázat diatomické molekuly plynů. Naopak některé typické, dlouho známé senzory plynů mohou za jistých okolností detekovat i přítomnost hemu [22]. Tato změna vlastností hemoproteinů je velice často doprovázena zmiňovanou výměnou axiálních ligandů, z cysteinu na histidin. S tímto jevem se můžeme nejčastěji setkat v případě molekuly oxidu uhelnatého, který se váže zejména na Fe(II) a vytváří velmi stabilní komplex. Molekula kyslíku se také váže hlavně na hem, jehož iont železa je ve stavu Fe(II), ale tento komplex je často autooxidován na Fe(III) a může přitom docházet k tvorbě reaktivních forem kyslíku. Oxid dusnatý se může vázat na Fe(II) i Fe(III) hemový komplex, jeho deriváty však mají oxidační účinky a mohou interagovat s postranními zbytky aminokyselin na povrchu proteinu. Senzory hemu, které jsou schopné detekce některých plynů, však mají řadu vlastností, které nejsou typické pro hemové senzory plynů, a proto se stále řadí do skupiny senzorů hemu [18].

Senzorové proteiny detekující hem mají relativně flexibilní strukturu v porovnání s klasickými hemoproteiny. Při navázání hemu může docházet ke globálním strukturním změnám v rámci celého proteinu. Tato vlastnost je částečně ovlivněna koordinačním okolím hemu. Ve většině případů však platí, že sensorová doména postrádá jednoznačnou strukturu a teprve při detekci hemu jako primárního signálu dochází k postupným konformačním změnám. Ty ve výsledku působí jako sekundární signál, který se přenáší do funkční domény [18]. Vliv flexibility na vazebné schopnosti hemu je možné demonstrovat na mutantních formách proteinů, které mají jiný axiální ligand v porovnání s jejich protějšky divokého typu. I přes to, že dojde k záměně axiálního ligandu, protein může stále vázat hem prostřednictvím sousedních aminokyselinových zbytků podobného typu. Je vyžadována minimálně dvojí nebo trojí mutace aminokyselin v okolí vazebného místa, aby bylo možné zaznamenat změnu charakteru vazby hemu [37].

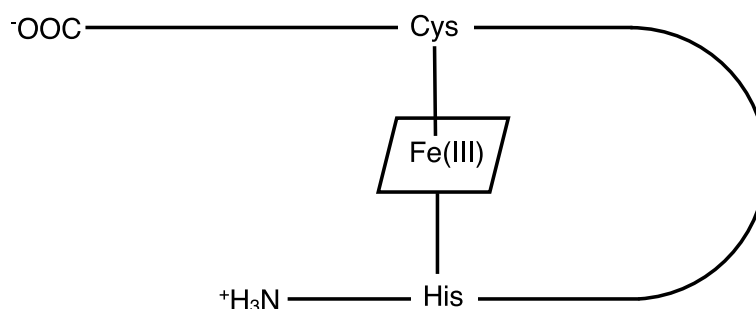
1.4.1 Inhibitor proteosyntézy regulovaný hemem (HRI)

Proteosyntéza je složitý vícekrokový proces, který v sobě zahrnuje fáze iniciace, elongace a terminace. Iniciace proteosyntézy vyžaduje vznik ternárního komplexu, jehož součástí jsou eukaryotický iniciační faktor 2 (eIF2), Met-tRNA_i a GTP. Tento ternární komplex je nutný pro rozpoznání start kodonu na mediátorové RNA (mRNA), a tím nastartování samotné proteosyntézy. Vytvoření tohoto komplexu je regulováno fosforylací, ke které dochází na eIF2. Tento protein se vyskytuje ve formě, který se nachází v aktivním stavu pokud je na něj navázáno GTP. V případě, že je na něj navázán guanosindifosfát (GDP), je neaktivní. Přechod z neaktivní formy tohoto proteinu na aktivní formu je podmíněn náhradou GDP za GTP. Za normálních fyziologických podmínek má eIF2 vyšší afinitu k GDP, proto musí být tato výměna nukleotidů katalyzována eukaryotickým iniciačním faktorem 2B (eIF2B). Fosforylace eIF2 na α podjednotce vede ke zvýšení afinity eIF2 k eIF2B. Zatímco nefosforylovaný eIF2 působí pro eIF2B jako přirozený substrát, tak po fosforylaci začíná eIF2 působit jako inhibitor. Přestává docházet k výměně nukleotidů, čímž klesá buněčná koncentrace aktivní formy eIF2 s navázaným GTP. Skupina proteinů označovaných jako eIF2 α kinasy fosforylují aminokyselinový zbytek Ser51 na α podjednotce eIF2, čímž je zabráněno vytvoření ternárního komplexu a proteosyntéza neprobíhá [39, 40].

Aktivita eIF2 α kinas je ovlivňována řadou faktorů jako akumulace denaturovaných proteinů, nedostatek aminokyselin, virová infekce nebo nedostatek hemu [18]. Inhibitor proteosyntézy regulovaný hemem (HRI) patří do rodiny eIF2 α kinas a jeho aktivita je ovlivněna právě přítomností molekuly hemu [39]. Při nedostatku hemu dojde nejprve k jeho disociaci ze sensorového místa HRI. Následuje autofosforylace HRI, protein je tak stabilizován a může dojít k fosforylaci eIF2 α . V průběhu vývoje erytrocytů HRI řídí translaci mRNA pro globinové proteiny. Dostatečná koncentrace hemu v tomto případě umožňuje vytvoření velkého množství hemoglobinu pro prekurzory erytrocytů [38, 41]. Za normálních podmínek se koncentrace volného hemu v erytrocytech pohybuje v rozmezí 0,1–10 μ M. Taková koncentrace je dostatečná k tomu, aby se hem navázal na HRI a zabránil fosforylaci eIF2 α [18]. HRI hraje také velmi důležitou roli při poruchách jako deprivace železa nebo β -thalasemie, kdy

reguluje neefektivní erytropoézu [41]. Přítomnost iontů těžkých kovů značně inhibuje aktivitu HRI [18].

Jedním axiálním ligandem hemového železa v HRI je thiolátová skupina cysteinu nacházející se v C-koncové (funkční) doméně. Druhým axiálním ligandem je imidazolová skupina histidinu, která se nachází v N-koncové (senzorové) doméně. K intramolekulární interakci mezi těmito dvěma vzdálenými doménami dochází pouze v přítomnosti hemu. Znamená to, že HRI je velmi flexibilní a při vazbě hemu podstupuje značné strukturní změny (viz Obrázek 4) [37].



Obrázek 4. Schématické znázornění struktury HRI. Jeden axiální ligand, cystein, se nachází v C-koncové (funkční) doméně a druhý axiální ligand, histidin, se nachází v N-koncové (senzorové) doméně. Vazba hemu na HRI způsobuje přiblížení dvou vzdálených domén a dochází ke globální strukturní změně v rámci celého proteinu, tímto mechanismem inhibuje kinasovou aktivitu HRI. Převzato a upraveno dle [21].

1.4.2 Bach1

Bach1 je transkripční faktor, který reguluje transkripci genů pro proteiny ovlivňující buněčný cyklus a proteiny spjaté s distribucí iontu železa či metabolismem volného hemu [42, 43]. Jeho název je akronymem, který je odvozen z pojmenování jedné z jeho důležitých domén (BTB, z anglického „Broad-Complex, Tramtrack and Brick a brace“ a skupiny transkripčních faktorů, jejíž členem tento protein je (CNC, z anglického „Cap’n’collar“). Název tohoto proteinu je tedy BTB a CNC homolog 1 (Bach1). Jedná se o poměrně rozšířený transkripční faktor přítomný především v organismech savců. Lidská forma tohoto proteinu je tvořena 736 aminokyselinami. Na N-konci Bach1 se nachází BTB doména, která slouží k interakci a oligomerizaci s dalšími proteiny. Na C-konci se nachází doména bazických leucinových zipů (bZIP), která zodpovídá zejména za vazbu na DNA, ale také zprostředkovává tvorbu heterodimerů s malými proteiny svalově-apneurotického fibrosarkomu (Maf, z anglic-

kého „musculoapneurotic fibrosarcoma“). Dochází-li ke vzniku daných heterodimerů, tak nastává inhibice transkripce příslušných genů [44]. V oblasti C-koncové domény Bach1 se také nachází aminokyselinová sekvence označovaná jako jaderný exportní signál (NES, z anglického „nuclear export signal“), která je při reakci na určitý podnět aktivována a indukuje jaderný export Bach1. Bach1 nese ve své struktuře šest CP motivů (označované CP1 až CP6), čtyři (CP3 až CP6) se nacházejí v oblasti C-konce a umožňují vazbu molekuly hemu (viz Obrázek 5). Mechanismus interakce s hemem však doposud není zcela prozkoumán. Je ovšem známo, že Bach1 je schopen vázat více než jednu molekulu hemu. Oblast, ve které dochází k vazbě hemu na protein, nemá definovanou strukturu a dochází zde k neustálým dynamickým změnám. Z tohoto důvodu využívá Bach1 pravděpodobně různých strategií umožňujících jeho interakci s hemem. Dochází nejen ke koordinaci centrálního iontu železa pomocí CP motivu za vzniku pentakoordinovaného komplexu, ale byla také zaznamenána tvorba hexakoordinovaného komplexu, který indukuje odštěpení Bach1 z dvoušroubovice DNA [42, 45].



Obrázek 5. Schématické znázornění domén a důležitých regulačních oblastí Bach1. Zeleně je znázorněna BTB doména. Modře jsou znázorněny jednotlivé CP motivy (CP1 až CP6). Žlutě je znázorněna bZIP doména. Červeně je znázorněn jaderný exportní signál (NES). Převzato a upraveno dle [44].

Bach1 působí především jako represor transkripce. Tato represe se uskutečňuje tak, že dochází k tvorbě zmíněného heterodimeru mezi Bach1 a malým proteinem z rodiny Maf. Heterodimer Bach1-Maf se posléze váže na sekvenci DNA v oblasti promotoru označovanou jako rozpoznávací element Maf. Touto vazbou inhibuje transkripci genů pro hemoxygenasu-1 (HO-1), ferritin nebo ferroportin. Při navázání molekuly hemu na Bach1 dochází ke snížení afinity heterodimeru Bach1-Maf k dvoušroubovici DNA a disociaci daného heterodimeru. Vazba hemu na Bach1 nejen deaktivuje jeho funkci jako represoru, ale také indukuje jeho export ven z jádra a polyubikvitinaci. Ubikvitinovaný Bach1 se váže na ubikvitin-ligasu a je posléze degradován v proteazomu [18]. Export proteinu Bach1 z jádra může být také spuštěn pomocí jeho fosforylace na postranním řetězci Tyr486, přičemž tato fosforylace je indukována přítomností antioxidantních činidel. Kadmium je jedním ze signálů aktivu-

jících NES. Jaderný export proteinů je důležitou součástí mechanismu, který chrání buňku před oxidačním stresem, vystavením těžkých kovů a dalšími poškozeními [46].

Nadměrná exprese Bach1 vede k většímu výskytu reaktivních forem kyslíku, které způsobují vyšší apoptózu buněk a sníženou úroveň angiogeneze. Důvodem je především to, že Bach1 inhibuje expresi genů pro proteiny, které se podílejí na snižování oxidačního stresu. Jedním z těchto proteinů je HO-1, která katalyzuje první krok degradace hemu. Hem je degradován na biliverdin, oxid uhelnatý a železnatý iont. Oxid uhelnatý má protizánětlivé účinky a biliverdin je rychle redukován na bilirubin, jenž působí jako antioxidant. Bach1 rovněž reguluje transkripci genů pro proteiny účastníci se apoptózy a buněčného cyklu. Jedná se například o transkripční faktor E2F1, cyklin-dependentní kinasu 6 nebo kalmodulin 1. Jeho vliv na proliferaci buněk však závisí na druhu buňky a experimentálních podmínkách. Zvýšená exprese Bach1 v buňkách endotelu vede k inhibici proliferace a exprese cyklinu D1, jehož hladina je stěžejní pro regulaci buněčného cyklu. Zároveň dochází k nárůstu koncentrace kaspasy 3, která indukuje apoptózu. Nicméně nedostatek Bach1 v buňkách hladké svaloviny taktéž inhibuje jejich proliferaci. Fosforylovaný Bach1 je schopen interagovat s receptorem pro motilitu zprostředkovanou hyaluronanem a jaderným exportinem Crm1 (z anglického „chromosomal region maintenance 1“), čímž pomáhá stabilizovat dělicí vřeténko v průběhu mitózy. Bach1 tedy ovlivňuje proliferaci buněk dvěma cestami, buďto jako regulátor transkripce genů pro proteiny buněčného cyklu, nebo zodpovídá za správné seřazení chromosomů v průběhu mitotického dělení buněk [44, 47].

1.4.3 Neuronální PAS-doménový protein 2 (NPAS2)

Systém řídící cirkadiánní rytmy savců je lokalizován v oblasti hypothalamu označované jako suprachiasmatické jádro [48]. Cirkadiánní rytmy jsou na molekulární úrovni regulovány řadou transkripčních a translačních zpětnovazebných smyček. Jedním z transkripčních regulátorů ovlivňující projevy cirkadiánních rytmů je neuronální PAS-doménový protein (NPAS2) [49]. NPAS2 utváří heterodimer s proteinem BMAL1 (z anglického „brain and muscle Arnt-like protein 1“). NPAS2-BMAL1 heterodimer se poté váže na „enhancerovou“ sekvenci DNA, což vede k zesílení transkripce genů pro proteiny z rodiny Period (PER) a Cryptochrome (CRY) [37].

Tyto proteiny zpětnovazebně regulují vlastní expresi, a zajišťují tak správnou činnost cirkadiánních rytmů [48]. U proteinů PER1, PER2 a CRY1 byla mimo jiné zaznamenána schopnost vázat molekulu hemu [18].

Na N-konci NPAS2 se nachází doména bazické povahy se strukturou „helix-smyčka-helix“ a dvě PAS domény, kam se může vázat hem. BMAL1 obsahuje ve své struktuře podobné domény, avšak hem s tímto protein pravděpodobně neinteraguje. K vazbě heterodimeru NPAS2-BMAL1 na dvoušroubovici DNA dochází především za určité koncentrace redukované formy nikotinamidaadenin dinukleotid-fosfátu (NADPH), konkrétně, když pohybuje v rozmezí 3–5 mM. Podstatné je to, že NADPH podporuje schopnost interakce NPAS2-BMAL1 s DNA i v případě, že na NPAS2 není navázán hem. Hem ovšem značně zvyšuje afinitu NPAS2 k DNA i v absenci BMAL1. Znamená to tedy, že přítomnost hemu není podmínkou k tomu, aby se heterodimer NPAS2-BMAL1 vázal k DNA. Bylo též zaznamenáno, že oxid uhelnatý je schopný se v přítomnosti NADPH a za anaerobních podmínek vázat jako axiální ligand na iont železa hemu v NPAS2-BMAL1. Takovým způsobem dochází k porušení vazby heterodimeru s DNA. Oxid uhelnatý se ovšem váže na iont železa zejména v oxidačním stavu Fe(II), je tedy pravděpodobné že NADPH napomáhá redukcí Fe(III) na Fe(II) [18]. Axiálními ligandy hemového železa v jedné z PAS domén NPAS2 jsou His119 a Cys170. Změní-li se oxidační stav železa z Fe(III) na Fe(II), dochází k výměně Cys170 za His171. Tato záměna ligandů vlivem redoxního stavu centrálního iontu je běžná pro senzory hemu (viz kapitola 1.4) [37]. Mutace ovlivňující sekvenci nukleotidů kódujících His119 a His171 způsobují narušení tvorby heterodimeru NPAS2-BMAL1 a značně snižují jeho schopnost vázat se na DNA [18].

1.5 Protein p53

Objev proteinu p53 byl učiněn v roce 1979 při výzkumu virové karcinogeneze, konkrétně polyomaviru SV40 (z anglického „simian virus 40“). Bylo zjištěno, že velký tumorový antigen SV40 vytvářel komplex s neznámým buněčným proteinem. S použitím elektroforézy na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE) bylo vyhodnoceno, že molekulová hmotnost tohoto neznámého proteinu je přibližně 53 kDa [50]. Protein získal název p53 právě na základě tohoto

výsledku. Jak se ale později ukázalo, jednalo se pouze o hrubý odhad a molekulová hmotnost lidské formy p53, daná sumou molekulových hmotností aminokyselinových zbytků, je 43,7 kDa. Tento značný rozdíl v molekulových hmotnostech je podle všeho způsoben přítomností regionu bohatého na prolin ve struktuře p53, který zpomaluje jeho migraci v polyakrylamidovém gelu [51].

Zprvu se o p53 uvažovalo jako o onkogenu. Důvodem byla jeho schopnost kooperace s jinými známými onkogeny, akumulace a nadměrná exprese v nádorových buňkách. Později však byla v nádorových buňkách zaznamenána nadměrná četnost mutací v genu kódujícím p53, *TP53*. V buňkách kolorektálního karcinomu docházelo následkem mutací nebo delecí ke ztrátě alel divokého typu p53, zatímco exprese divokého typu p53 vedla k potlačení maligní transformace buněk. Zjistilo se, že tyto mutace vedou ke pozměnění struktury proteinu a ztrátě jeho schopnosti vázat se na DNA. O p53 se tedy přestalo uvažovat jako o onkogenu, nýbrž jako o tumor supresoru. Potvrdilo se též, že k mutacím genu *TP53* nedochází jen v případě kolorektálního karcinomu, ale v případě většiny známých nádorových onemocnění lidské populace. Tisíce prací ukázaly, že přibližně u poloviny všech zkoumaných druhů nádorů jsou přítomné mutace v genu *TP53*. Jedná se zřejmě v dnešní době o nejvíce mutovaný, ale zároveň nejvíce analyzovaný gen v souvislosti s rakovinou [51, 52].

Do rodiny proteinů p53 patří také proteiny p63 a p73. Ty jsou zodpovědné především za udržení správného průběhu embryogeneze a buněčné diferenciaci, za určitých podmínek však podobně jako p53 vykazují tumor supresorovou aktivitu [53].

1.5.1 Strukturní charakteristiky proteinu p53

Lidská forma p53 se skládá z 393 aminokyselin tvořících několik funkčních domén. N-koncová oblast je tvořena dvěma autonomními transaktivačními doménami, TAD1 a TAD2, a regionem bohatým na prolin (PRR, z anglického „proline-rich region“). Transaktivační domény mohou interagovat s mnoha regulačními makromolekulami, které ovlivňují aktivitu p53 [54]. PRR obsahuje pět motivů Pro-X-X-Pro (kde X reprezentuje jakoukoliv aminokyselinu), na které se mohou vázat specifické proteiny. PRR se prokázal být důležitý pro regulaci tumor supresorové aktivity proteinu p53 [55]. Jednonukleotidový polymorfismus kodonu 72 v genu *TP53* se projevuje na aminokyselinové sekvenci PRR. Jedná se o jeden z nejběžnějších polymorfismů v tomto

genu. V lidské populaci se vyskytují dvě alely, jedna vede k expresi Arg72 a druhá Pro72. Zkoumání vlivu tohoto polymorfismu na rozvoj rakoviny poskytuje množství sporných výsledků. Avšak forma proteinu p53 obsahující Arg72 je spojována s lepší schopností vyvolat apoptózu, a tím potlačit rozvoj nádorového bujení [56–58]. Celkově je N-koncová oblast p53 poměrně flexibilní a podstupuje neustálé konformační změny [59].

Následuje vysoce evolučně konzervovaná DNA-vazebná doména (DBD, z anglického „DNA-binding domain“). V trojrozměrné struktuře DBD se vyskytují především motivy „ β -sandwich“ podobně jako v imunoglobulinech. Struktura DBD je také stabilizována zinečnatým iontem, který je koordinován čtyřmi ligandy, konkrétně jedním histidinovým a třemi cysteinovými zbytky (Cys176, His179, Cys238 a Cys242) [60–62]. Přibližně 90 % všech mutací v genu *TP53* spojených se vznikem nádorů se projevuje právě v této doméně. Jedná se především o „missense“ mutace, při kterých záměna jednoho nukleotidu v sekvenci DNA způsobuje zařazení nesprávné aminokyseliny [59, 60]. DBD zodpovídá za vazbu p53 ke specifické oblasti na dvoušroubovici DNA. Tato oblast je dána dvěma za sebou jdoucími úseky konsensus sekvencí RRRCWWGYYY (R = A/G, W=A/T, Y=C/T), které mohou být odděleny segmentem dlouhým až 13 párů bází (bp, z anglického „base pair“) [60, 62, 63].

Dále následuje oligomerizační doména (OD), která zodpovídá za vznik homotetramerní formy p53. Jedná se o majoritní formu, ve které se p53 přirozeně vyskytuje v buňce, přičemž každý z monomerů se váže na jednu konsensus sekvenci DNA [63]. Na úplném konci se nachází C-terminální doména (CTD). Tato oblast je cílem řady posttranslačních modifikací, zejména acetylace lysinových zbytků a fosforylace hydroxyskupin postranních řetězců, kterými je modulována aktivita p53 [54]. Podobně jako N-koncová oblast, CTD nemá v roztoku žádnou stálou konformaci, při interakci s dalšími proteiny však dochází k její stabilizaci a je možné zaznamenat vznik definovaných α -helikálních struktur či smyček [64]. Tato doména je také schopná interagovat s DNA, ovšem, na rozdíl od DBD, se neváže na žádnou specifickou sekvenci, nýbrž zde dochází k nespecifické elektrostatické interakci mezi kladně nabitými lysinovými zbytky CTD a záporně nabitou cukr-fosfátovou kostrou DNA. Takovým způsobem je zajištěn posun p53 po páteři DNA, který usnadňuje rozpoznání specifické sekvence na kterou se váže DBD [54]. CTD je též stěžejní pro vazbu p53 na

nekanonické sekundární struktury DNA jako G-kvadruplex nebo TAT triplex [63, 65].

Termodynamická stabilita celého proteinu je určována na základě DBD, která je pouze marginálně stabilní a již při teplotě 37 °C rapidně osciluje mezi „sbaleným“ a „nesbaleným“ stavem. To může následně způsobit ireverzibilní agregaci celého proteinu [62, 66]. Označení p53 se také nevztahuje pouze na jediný protein. Z důvodu přítomnosti dvou promotorů v genu *TP53* a prostřednictvím alternativního sestřihu může lidský organismus exprimovat až dvanáct isoform p53 o různých molekulových hmotnostech. Tyto isoformy obvykle postrádají některé úseky N- a C-koncových oblastí, společně pak ale mohou regulovat řadu buněčných funkcí [67, 68]. Jednotlivé oblasti a domény proteinu p53 jsou znázorněny na Obrázku 6.



Obrázek 6. Schématické znázornění domén lidské formy p53. Zeleně jsou znázorněny transaktivační domény (TAD1 a TAD2). Šedý pruh znázorňuje region bohatý na prolin (PRR). Růžově je znázorněna DNA-vazebná doména (DBD). Žlutě je znázorněna oligomerizační doména. Červeně je znázorněna C-terminální doména. Převzato a upraveno dle [54].

1.5.2 Hlavní funkce a regulace aktivity proteinu p53

Aktivita p53 představuje jednu z hlavních odpovědí na buněčný stres. Je-li buňka pod působením stresu jako je poškození DNA, aktivace onkogenů, hypoxie nebo nutriční deprivace, dochází kaskádou posttranslačních modifikací k aktivaci p53. Ten následně pozitivně reguluje expresi cílových genů, které rozhodují o tom, co se bude dále s buňkou dít. Protein p53 působí výhradně jako transkripční aktivátor. I přesto, že konečným výsledkem působení p53 může být inhibice transkripce některých genů, tak ji zprostředkovává pouze nepřímo [69].

Jednou z možných odpovědí p53 na poškození DNA je spuštění exprese proapoptotických proteinů, PUMA (z anglického „p53 upregulated modulator of apoptosis“), BAX (z anglického „Bcl-2-associated X protein“) nebo NOXA (z latinského „noxa“, tj. poškození). Tyto proteiny indukují uvolnění cytochromu *c* z mitochondrií. V cytosolu se cytochrom *c* váže na apoptotický faktor 1 aktivující proteasu (APAF1), který

indukuje činnost kaspasy 9 a dále následuje efektorová fáze apoptózy [70]. Tento druh apoptózy se označuje jako vnitřní (intrinická), protože dochází zde k uvolnění cytochromu *c* a dalších proteinů z mitochondrií. Protein p53 je však schopen zprostředkovat i vnější (extrinickou) apoptózu. Vnější apoptóza je charakterizována tím, že dochází k navázání ligandů na transmembránové receptory z rodiny tumor nekrotických faktorů (TNF), které kaskádou reakcí vyvolají apoptózu. Mezi TNF receptory patří například Fas nebo DR5 (z anglického „death receptor 5“), přičemž transkripce jejich genů je regulována pomocí p53. Poté, co je receptor Fas aktivován ligandem FasL, dochází k asociaci Fas a adaptorového proteinu FADD (z anglického „Fas associated death domain“), tyto dva proteiny vytváří komplex známý pod názvem DISC (z anglického „death-inducing signaling complex“). Ten je schopen aktivovat kaspasu 8, která zahájí apoptózu [71, 72]. DR5 působí obdobně jako Fas, s tím rozdílem, že je aktivován ligandem TRAIL (z anglického „TNF-related apoptosis-inducing ligand“) [73].

Protein p53 je schopen nepřímo potlačit expresi genů nezbytných pro správný průběh buněčného cyklu, a přivodit tak jeho zástavu, spouští například transkripci genu pro inhibitor cyklin-dependentních kinas, p21. Přímou inhibicí cyklin-dependentních kinas je omezena fosforylace některých proteinů, jež ve své nefosforylované podobě mohou společně s ostatními proteiny vytvořit komplex označovaný jako DREAM (z anglického „dimerization partner, RB-like, E2F and multi-vulval class B“). DREAM působí jako transkripční represor a svojí vazbou na specifické oblasti DNA brání transkripci genů podílejících se na přímé regulaci buněčného cyklu [74, 75].

Kromě těchto základních funkcí má p53 také vliv na opravy poškozené DNA. Indukuje transkripci genů pro XPC (z anglického „Xeroderma pigmentosum group C-complementing protein“) a DDB2 (z anglického „DNA damage-binding protein 2“), které se účastní excizních oprav nukleotidů [69]. Cílové geny p53 mohou také zasahovat do mnoha metabolických drah. Exprese proteinu TIGAR (z anglického „TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator“) je regulována prostřednictvím p53. TIGAR je fruktosa-2,6-bisfosfatasa působící jako negativní regulátor glykolýzy a upřednostňuje tak průběh pentosafosfátového cyklu [76, 77].

Ve zdravých buňkách, které nejsou pod působením stresu, je fyziologická koncentrace p53 udržována na relativně nízké úrovni prostřednictvím ubikvitin ligasy MDM2

(z anglického „mouse double minute homolog 2“) a jejím homologem MDM4. MDM2 indukuje jaderný export p53 a jeho proteazomální degradaci. MDM4 nedisponuje ubikvitin ligasovou aktivitou, tvorbou heterodimerů s MDM2 však zabraňuje jeho autoubikvitinaci. MDM4 má také schopnost se vázat na TAD2 proteinu p53, čímž přímo inhibuje jeho aktivitu [66, 78]. Je-li v buňce zaznamenán stres, dochází ke stabilizaci p53. Tato stabilizace může probíhat řadou různých mechanismů, přičemž záleží na povaze stresového podnětu. Poškození DNA například podporuje aktivitu kasein kinasy 1, která fosforyluje threoninový zbytek p53 (Thr18) [79], a tak zabraňuje interakci s MDM2 a následné degradaci p53. Onkogenní signalizace naopak indukuje působení tumor supresoru ARF (z anglického „alternate reading frame“), jehož funkcí je přímá inhibice MDM2 [80]. Gen kódující MDM2, *MDM2*, je také cílovým genem p53. Jakmile je oxidativní stres překonán, je p53 schopen zpětnovazebným mechanismem opět spustit transkripci genu pro MDM2 a regulovat tak svoji fyziologickou koncentraci v buňce [81].

1.5.3 Interakce proteinu p53 s hemem a významnými senzory proteiny

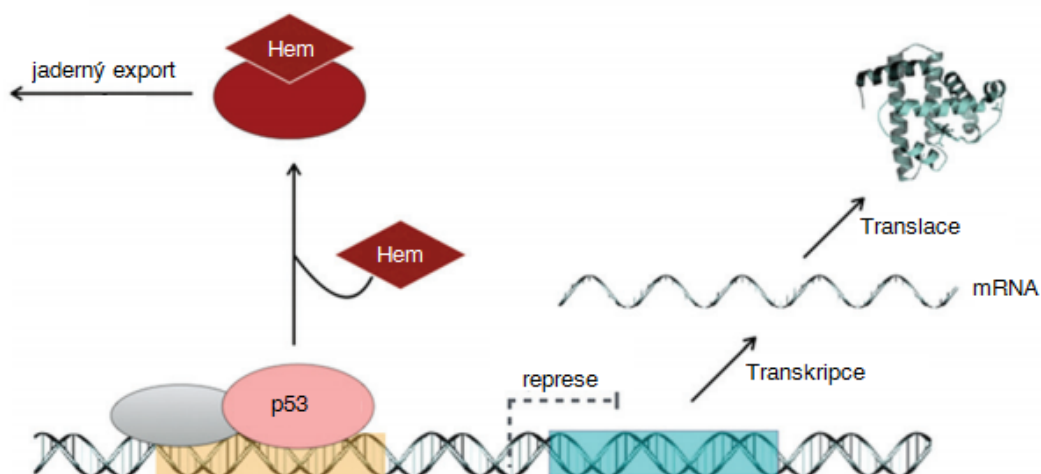
Železo je esenciálním prvkem pro správnou činnost buněk. Jeho přebytek však může být rizikovým faktorem při mnoha nádorových onemocněních. Hereditární hemochromatóza je dědičná porucha a pacienti, kteří jí trpí, mají narušený metabolismus železa. To vede k jeho nežádoucí akumulaci v buňkách mnoha orgánů. Organismus může využít železo ve dvou podobách, a to jako hemové železo nebo nehemové železo. Pro každou z těchto forem se využívá jiného mechanismu absorpce. K absorpci nehemového železa v podobě iontů železa dochází ve dvanáctníku. Je nejprve redukováno na povrchu enterocytů na dvojmocné, v tomto stavu je pak transportováno do buňky. Hem většinou proniká do enterocytů endocytózou, uvnitř je poté degradován pomocí HO-1. Iont železa se přes degradaci erytrocytů také dostává do makrofágů. Z makrofágů či enterocytů může být potom transportován s pomocí transferinového receptoru do hepatocytů. Hlavním mechanismem pro detekci iontů železa v okolí hepatocytů je interakce mezi membránovým proteinem regulujícím distribuci železa (HFE, z anglického „high Fe(II)“) a transferinovým receptorem. Je-li zvýšená koncentrace železa, dochází v hepatocytech k expresi hepcidinu. Hepcidin

se váže na ferroportin makrofágů a enterocytů. Takovým způsobem brání dalšímu exportu iontů železa z buněk, ale snižuje se zároveň jejich absorpce [82, 83].

Mutace v genech pro výše zmíněné proteiny jsou označovány za hlavní faktory způsobující onemocnění známé jako hereditární hemochromatóza. Studie na myších s deletovaným genem pro HFE potvrdily podstatně nižší koncentrace p53 v jejich hepatocytech v porovnání s myši divokého typu. Myši s deletovaným genem rovněž vykazovaly řadu podobných symptomů jako pacienti trpící hereditární hemochromatózou, například nadbytek železa v jaterních tkáních. Taktéž testy provedené na myších divokého typu s nadměrným příjmem železa ve stravě ukázaly, že i v takovém případě dochází k poklesu hladiny p53. Poruch distribuce železa a jeho akumulace v organismu tedy pravděpodobně souvisí se snížením koncentrace p53 a může tak přispívat ke karcinogenezi. Experimenty provedené v téže studii dále poukázaly na následující souvislosti mezi homeostázou p53, hospodařením s iontem železa a metabolismem hemu [1].

V primární struktuře p53 byly objeveny tři CP motivy, které by mohly sloužit jako potenciální místa pro vazbu hemu. Tento předpoklad byl posléze potvrzen několika dalšími experimenty a bylo zjištěno že se hem váže k p53 v poměru 1 : 1. Třetí CP motiv se nachází v sekvenci Cys275-Ala-Cys277-Pro a právě aminokyselinové zbytky Cys275 a Cys277 hrají stěžejní roli při interakci p53 s molekulou hemu. Tato sekvence je mimo jiné lokalizována v C-koncové oblasti DNA-vazebné domény p53, navázání hemu pravděpodobně přímo zasahuje do vazebné interakce mezi p53 a dvoušroubovicí DNA. Hem takovým způsobem ovlivňuje schopnost p53 indukovat transkripci cílových genů. Je zasažena především transkripce genů pro proteiny p21 a BAX [1].

Působení hemu také urychluje degradaci p53. Savčí formy p53 obsahují ve své struktuře jak N-koncový, tak C-koncový NES. Vazba hemu na p53 patrně pomáhá prostřednictvím konformačních změn odhalit C-koncový NES, pomocí něhož interaguje s jaderným exportinem Crm1, který indukuje export p53 z jádra do cytosolu. V cytosolu potom probíhá jeho polyubikvitinace a proteazomální degradace (viz Obrázek 7, strana 29) [1].



Obrázek 7. Hypotetický mechanismus regulace aktivity p53 pomocí molekuly hemu. V absenci hemu je p53 ve své homotetramerní formě navázán na dvoušroubovici DNA. Navázání hemu způsobí odštěpení p53 od DNA. Protein p53 je posléze exportován ven z jádra a podléhá degradaci v proteazomu. Převzato a upraveno dle [18].

Podobně jako v případě NPAS2 (viz kapitola 1.4.3), zdá se, že také protein p53 interaguje nejen s hemem, ale jeho prostřednictvím i s oxidem uhelnatým nebo oxidem dusnatým. Je tedy pravděpodobné, že p53 má schopnost nejen detekovat přítomnost hemu, ale také diatomických molekul plynů [1].

Při léčbě nádorových onemocnění se někdy využívá chelatačních činidel železa, jejichž cílem je vytvářet komplexy s ionty železa přítomnými v organismu. Jednou z takových látek je deferoxamin. Deferoxamin potlačuje proliferaci mnoha druhů nádorových buněk tím, že inhibuje syntézu DNA. Zastavuje tak přechod buněk z G1 do S fáze buněčného cyklu a indukuje jejich apoptózu [84]. Působení chelátorů železa taktéž vede k vyššímu výskytu proteinů p53, p63 a p73. V proteinech p63 a p73 patřících do rodiny p53 je také přítomen hemový regulační motiv. Obdobně, vazba hemu interakce s hemem vede k jejich jadernému exportu a degradaci v cytosolu [1].

Nadbytek železa a akumulace hemu v organismu může také podporovat zvýšenou tvorbu reaktivních forem kyslíku a poškození intracelulárních struktur včetně DNA. Aktivní p53 je v takové situaci klíčovým faktorem pro zmírnění stresových podmínek. Působení hemu však může omezit jeho aktivitu a přispívá tím k tumorogenezi [85]. Při působení oxidativního stresu může docházet v nádorových buňkách k tomu, že cytoplazmatický ferritin váže hem a přemísťuje se s ním do jádra buňky. V jádře ferritin interaguje s p53 a přenáší na něj molekulu hemu. p53 s navázaným hemem

opouští jádro a dostává se do cytosolu, kde je následně degradován v proteazomu. Tento proces je možno pozorovat u buněčné linie triple negativního karcinomu prsu. Je tedy pravděpodobné, že se může jednat o potenciální strategii přežití nádorových buněk proti působení oxidativního stresu [86].

PER2 se v cytosolu dokáže vázat na C-terminální doménu monomerní formy p53 za tvorby heterodimeru. Tento heterodimer dále putuje do jádra, kde se na něj naváže MDM2. MDM2 se váže na transaktivační doménu p53 a za normálních okolností je schopen katalyzovat ubikvitinaci p53. V tomto heterotrimerním stavu však k ubikvitinaci nedochází, p53 je tak stabilizován a nedochází k jeho degradaci [87, 88]. Jelikož se prokázalo, že deprivace železa potlačuje růst některých druhů nádorových buněk. Je tedy pravděpodobné, že účast molekuly hemu při interakci p53 a PER2, může mít vztah k hospodaření s hemovým železem [18]. Další významný senzor hemu, Bach1, je schopen vytvářet komplex s p53 na dvoušroubovici DNA. Přináší s sebou histondeacetylasi 1 a epigeneticky inhibuje transkripční aktivitu p53. Nicméně, při oxidativním stresu dochází ke snížení buněčné koncentrace Bach1, snižuje se tedy i koncentrace komplexu Bach1-p53. K této inhibici tedy pravděpodobně dochází především za stavu homeostáze. Tento proces je podobně jako v případě MDM2 (viz kapitola 1.5.2) regulován tumorovým supresorem ARF, který se váže na Bach1 a brání jeho interakci s p53 [89].

Z výše popsaného je patrné, že řada otázek týkajících se interakce proteinu p53 s hemem zůstává stále nezodpovězena. Proto je cílem této práce připravit protein p53 rekombinantní expresí a v dalších detailních studiích se zaměřit na otázku interakce p53 s hemem.

2 Cíle bakalářské práce

Pro předkládanou bakalářskou práci byly stanoveny následující cíle:

- Prvním cílem této práce bylo vytvořit souhrn nejaktuálnějších publikovaných poznatků o hemových senzorových proteinech se zaměřením na poznatky ohledně schopnosti proteinu p53 interagovat s hemem.
- Připravit plazmid pET-21c(+)/p53-Histag vhodný pro expresi eukaryotického proteinu p53 v buňkách *E. coli* BL-21(DE3).
- Transformovat buňky *E. coli* BL-21(DE3) plazmidem pET-21c(+)/p53-Histag a exprimovat v nich eukaryotický protein p53.
- Optimalizovat expresi proteinu p53 v buňkách *E. coli* BL-21(DE3).
- Izolovat protein p53 z buněk *E. coli* BL-21(DE3) a následně tento protein purifikovat.
- Optimalizovat proces izolace proteinu p53 z buněk *E. coli* BL-21(DE3).
- Předběžně charakterizovat izolovaný a purifikovaný protein p53 v jeho „apo-formě“.

3 Materiál a metody

3.1 Použité přístroje

Analytické váhy

ER-120A, A&D Instruments LTD

Autokláv

Panasonic MLS-37812

Bezdotykový kahan

Gasprofi2 SCS, VLD-TEC

Centrifuga

5415 R, Eppendorf

Gilson, GmC Lab

Janetzki K70D, MLW

Z383K, HERMLE

Elektroforetická aparatura

multiSUB Mini, Cleaver Scientific

Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad

FPLC stanice

ÄKTAprime plus™, GE Healthcare

Inkubátor

Economy Incubator Size 1, Gallenkamp

Kolona pro gelovou permeační chromatografii

Superdex 200 10/300 GL, GE Healthcare

Laminární box

BIO 126, Labox

Magnetická míchačka

KMO2 basic, IKA

Orbitální třepačka

Incubator Shaker, BT Lab Systems

Multitron Pro, INFORS HT

Multitron Standard, INFORS HT

Shaker SHO, Witeg

Předvážky

440-35N, KERN

Spektrofotometr

Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies

DS-11 Spectrophotometer, DeNovix

Suchá lázeň

Mini Dry Bath, MD-MINI, Major Science

Termocykler

FTGENE2D Techgene, Techne

Termostat

EVA-LS1-MT-S, VLM

Transiluminátor

Dark Reader, Clare Chemical Research

Ultracentrifuga

Optima™ LE-80K, Beckman Coulter

Ultrazvukový homogenizátor

Sonoplus HD 3100, sonda KE 76, Bandelin

Vibrační třepačka

ZX3, Velp Scientifica

Zdroj pro elektroforézu

PowerPac Basic Power Supply, Bio-Rad

3.2 Použitý materiál a chemikálie

BD Biosciences, USA

Bacto Tryptone, Bacto Yeast Extract

Bio-Rad, USA

peroxosíran amonný (APS), Precision Plus Protein™ Unstained Standards

BioTool, Švýcarsko

Quick-Fusion Cloning Kit

Clontech, USA

TALON® Metal Affinity Resin

Fluka, Švýcarsko

akrylamid, dodecylsíran sodný (SDS), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), lysozym, 2-merkптоethanol, N,N'-methylen-bis-akrylamid, tris(hydroxymethyl)aminoethan (Tris)

Invitrogen, USA

SYBR SAFE™ DNA Gel Stain

Lach-Ner, ČR

bromfenolová modř, chlorid sodný, dihydrogenfosforečnan draselný, glycerol, hydrogenfosforečnan draselný, kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), kyselina octová

New England BioLabs, USA

2-log DNA Ladder, CutSmart pufr, Gel Loading Dye, Monarch® DNA Gel Extraction Kit, Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, pufr Phusion® High-Fidelity, *NdeI*, *XhoI*

Pharmacia, Švédsko

agarosa

QIAGEN, Německo

QIAprep Spin Miniprep Kit

SERVA Electrophoresis, Německo

ampicilin, N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)

Sigma-Aldrich, USA

cOmplete™ ULTRA Tablets, „forward primery“, isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG), Luria-Bertani (LB) Agar, Luria-Bertani Broth, „reverse primery“

Stratagen, USA

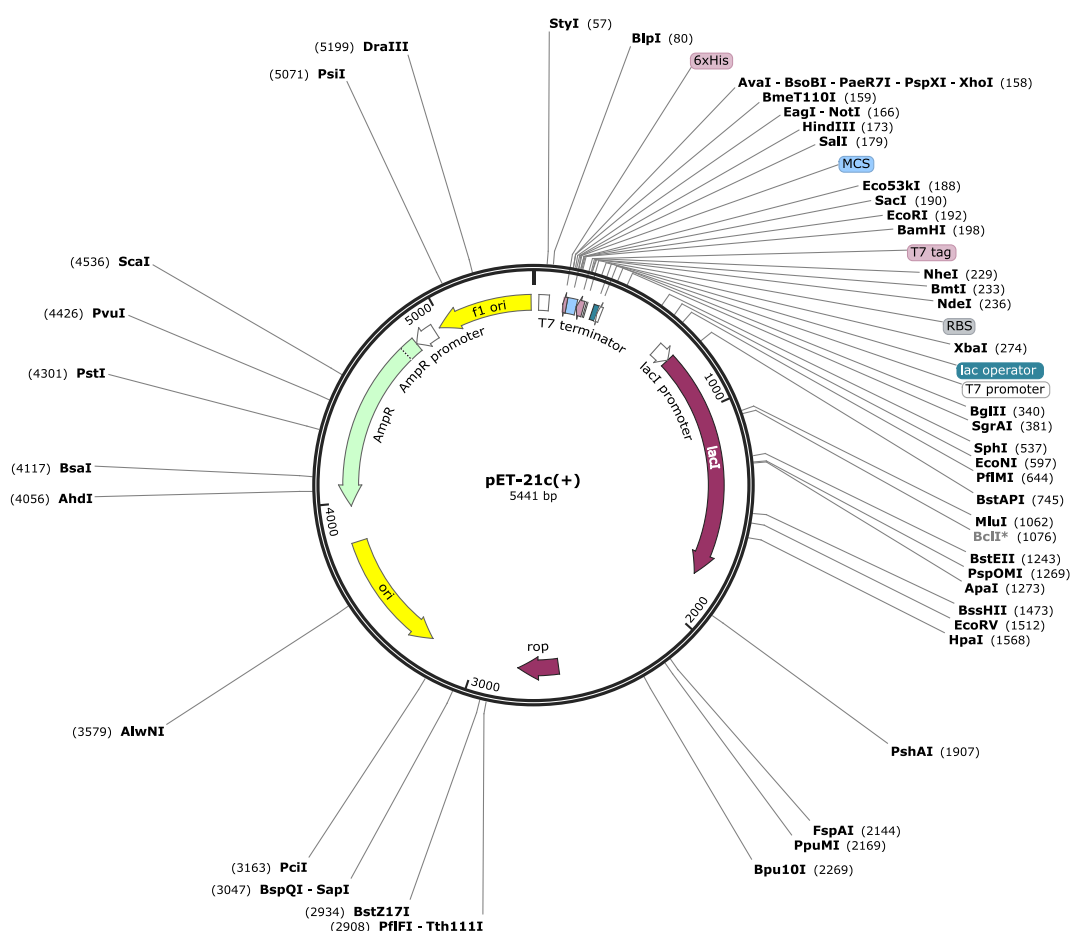
bakteriální kmeny *E. coli* DH5 α a *E. coli* BL-21(DE3)

Top-Bio, ČR

směs deoxynukleosidtrifosfátů (PCR dNTP mix)

Plazmid pET-21c(+)

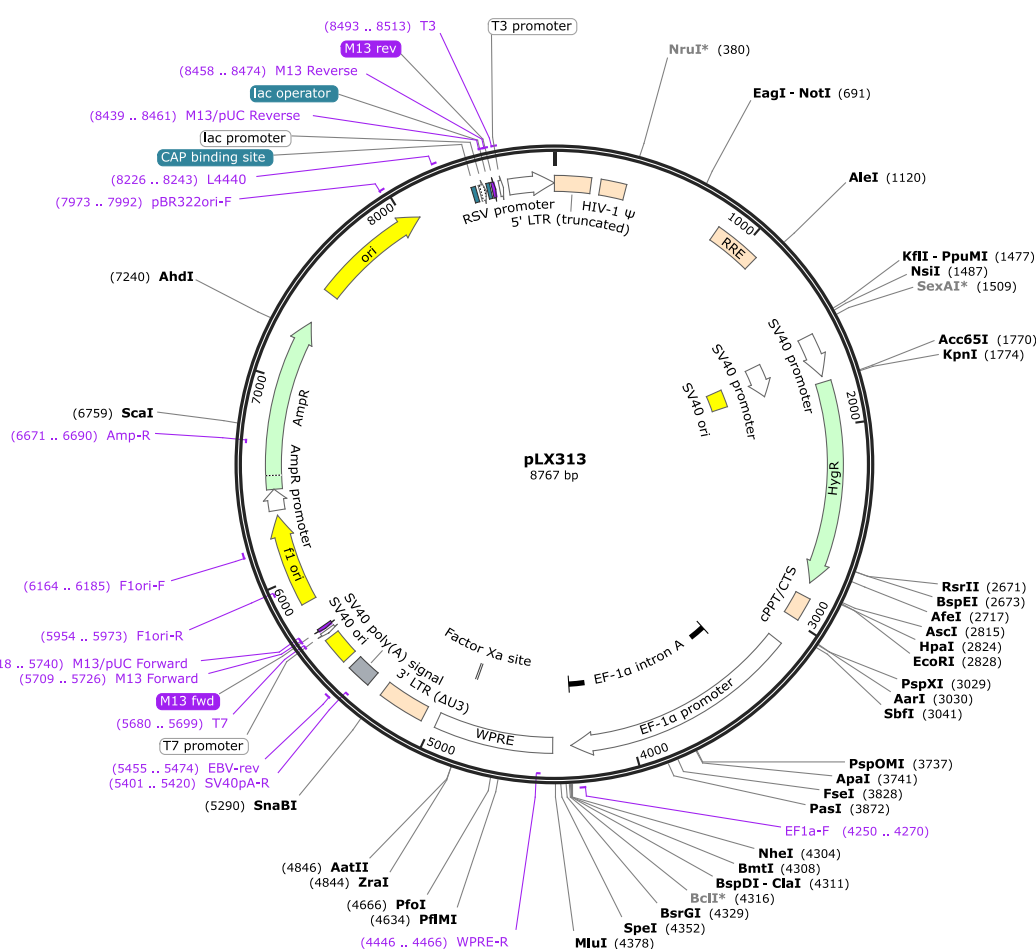
Plazmid pET-21c(+) byl poskytnut Mgr. Jakubem Vávrou a obsahoval „insert“ genu pro Bach1. Důležitým genem nacházejícím se ve vektoru pET-21c(+) je gen zprostředkovávající rezistenci vůči ampicilinu, působí jako tzv. selekční marker, který umožňuje selektivní kultivaci buněk transformovaných tímto plazmidem. Gen pro protein p53 byl do tohoto vektoru přenesen prostřednictvím restričních endonukleas *NdeI* a *XhoI*, za restričním místem pro endonukleasu *XhoI* se nachází tzv. histidinová kotva („Histag“) umožňující izolaci daného proteinu s pomocí afinitní chromatografie.



Obrázek 8. Restriční mapa plazmidu pET-21c(+) zobrazená prostřednictvím softwaru SnapGene® 5.1.3.1. Zelenou šipkou je znázorněn gen, který zajišťuje rezistenci vůči ampicilinu. Na pozici 158 se nachází restriční místo pro endonukleasu *XhoI* a na pozici 236 se nachází restriční místo pro endonukleasu *NdeI*, pomocí nichž byla provedena linearizace daného vektoru. Převzato z GSL Biotech; dostupné na snapgene.com.

Plazmid pLX313

Gen pro protein p53 byl dodán do naší laboratoře jako „insert“ ve vektoru pLX313. Tento plazmid byl poskytnut laboratořemi Williama Hahna a Davida Rota prostřednictvím neziskového repozitáře plazmidů Addgene. Pro prokaryotickou expresi je však tento plazmid nevhodný, proto byl gen pro p53 pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR) amplifikován a přenesen do vektoru pET-21c(+). Vektor pLX313 obsahuje ve své struktuře gen zajišťující rezistenci vůči ampicilinu, což umožnilo selektivní kultivaci očkovaných bakterií, které byly transformovány tímto plazmidem.



Obrázek 9. Restrikční mapa plazmidu pLX313 zobrazená prostřednictvím softwaru SnapGene® 5.1.3.1. Zelenými šipkami jsou znázorněny geny zajišťující rezistenci vůči ampicilinu a hygromycinu B. Převzato z GSL Biotech; dostupné na snapgene.com a upraveno dle [90].

Složení LB agarů

2,5 % (*w/v*) Luria-Bertani Agar

Složení LB média

4 % (*w/v*) Luria-Bertani Broth

Složení TB média

1,2 % (*w/v*) Bacto Tryptone; 2,4 % (*w/v*) Bacto Yeast Extract; 0,2 % (*w/v*) hydrogendifosforečnan draselný, 1,3 % (*w/v*) dihydrogen fosforečnan draselný; 0,4 % (*v/v*) glycerol

Nukleotidové sekvence „primerů“ použitých pro PCR amplifikaci genu proteinu p53

„forward“: 5'-GAAGGAGATATACATATGGAGGAGCCGCAGTCAG-3'

„reverse“: 5'-GGTGGTGGTGCTCGAGGTCTGAGTCAGGCCCTTCTG-3'

3.3 Použité metody

3.3.1 Příprava agarových ploten

Předem připravený sterilní LB agar byl rozpuštěn zahříváním v mikrovlnné troubě. Po přibližně 10 minutách inkubace při laboratorní teplotě byl přesunut do laminárního boxu (BIO 126, Labox), kde byla prováděna veškerá následující práce. Do sterilní zkumavky Falcon (50 ml) bylo převedeno 20 ml rozpuštěného LB agaru a pomocí automatické pipety k němu bylo přidáno 20 μ l roztoku ampicilinu (100 mg ml^{-1}). Obsah zkumavky byl jemně promíchán a aplikován po 10 ml do dvou sterilních Petriho misek. Krouživým pohybem s Petriho miskami byla daná směs rozprostřena rovnoměrně po celé jejich ploše. Petriho misky byly poté ponechány v laminárním boxu při laboratorní teplotě přibližně 30 minut.

3.3.2 Očkování bakteriální kultury

Plazmidem pLX313-TP53-WT (viz kapitola 3.2) byly transformovány bakterie, které byly do naší laboratoře zaslány ve formě bakteriálního vpichu v agarovém médiu. Pro izolaci tohoto plazmidu a za účelem dlouhodobého skladování bylo potřeba nejprve tyto bakterie očkovat do živného média na Petriho misce. Plazmid

pLX313-TP53-WT obsahuje ve své sekvenci gen zajišťující rezistenci bakterií vůči antibiotiku ampicilin (viz Obrázek 8, strana 37), proto byly nejprve připraveny agarové plotny obsahující ampicilin, což minimalizuje kultivaci bakterií, které tento plazmid postrádají (viz kapitola 3.3.1).

V laminárním boxu (BIO 126, Labox) byla v plameni kahanu sterilizována pinzeta, pomocí které byla uchopena sterilní dřevěná tyčinka, ta byla zasunuta do bakteriálního vpichu a byla jí nabrána část bakteriální kultury. Po vytažení byl pohybem dřevěné tyčinky vytvořen na povrchu agaru pruh široký přibližně 2 cm a dlouhý 3 cm. Novou sterilní dřevěnou tyčinkou byl do nového pruhu rozetřen konec předchozího pruhu. Tento postup byl zopakován ještě jednou, dohromady byly na agarové plotně tři pruhy křížového roztěru. Agarové plotny byly opatřeny víčkem a uzavřeny parafilmem. Byly umístěny do inkubátoru (Economy Incubator Size 1, Gallenkamp) a ponechány inkubovat po dobu 16 hodin při teplotě 37 °C.

Po uplynutí dané doby byly agarové plotny vyjmuty z inkubátoru a byly na nich vybrány dvě bakteriální kolonie. V laminárním boxu (BIO 126, Labox) bylo do dvou sterilních zkumavek Falcon (50 ml) umístěno 5 ml LB média a pipetováno 5 µl roztoku ampicilinu (100 mg ml⁻¹) a obsah zkumavek byl mírně promíchán. Sterilní pinzetou a dřevěnou tyčinkou byla přenesena zvolená kolonie z agarové plotny do zkumavky Falcon. Stejným postupem byla přenesena i druhá kolonie do druhé zkumavky Falcon. Obsah obou zkumavek byl ponechán inkubovat v orbitální třepačce po dobu 16 hodin, při teplotě 37 °C a 200 RPM (Incubator Shaker, BT Lab Systems).

3.3.3 Izolace plazmidové DNA

Pro izolaci plazmidové DNA byl využit komerční kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Buněčné kultury připravené dle postupu výše (viz kapitola 3.3.2) byly centrifugovány (Z383K, HERMLE; 10 min; 20 °C; 4500 RPM). Ze zkumavek Falcon byl odstraněn vzniklý supernatant. K peletě bylo přidáno 250 µl pufru P1 (součást soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit) a šetrným promícháváním pomocí automatické pipety byla peleta resuspendována. Celý obsah zkumavky Falcon byl převeden do mikrozkušavky Eppendorf. K vzniklé suspenzi bylo přidáno 250 µl pufru P2 (součást soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit) a mikrozkušavka byla jemně šestkrát převrácena. Mikrozkušavka byla ponechána 3 minuty inkubovat.

Poté do ní bylo přidáno 350 μ l pufru N3 (součást soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit). Mikrozkuřavka byla desetkrát rychle převrácena a následovala centrifugace při laboratorní teplotě po dobu 10 minut a 13200 RPM (5415 R, Eppendorf). Supernatant byl po centrifugaci převeden na kolonu speciální mikrozkuřavky QIAprep Spin Column (součást soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit). Byla provedena centrifugace při laboratorní teplotě po dobu 1 minuty a 13200 RPM, DNA byla zachycena na membráně kolony a filtrát byl odstraněn. Na kolonu bylo pipetováno 750 μ l pufru PE (součást soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit) a byla provedena centrifugace za stejných podmínek. Filtrát byl opět odstraněn a centrifugace byla zopakována. Kolona byla přemístěna do čisté mikrozkuřavky Eppendorf a těsně nad membránu bylo pipetováno 50 μ l pufru EB (součást soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit). Po 1 minutě inkubace byla provedena centrifugace při laboratorní teplotě po dobu 1 minuty a 13200 RPM. Kolona byla vyjmuta a ve výsledném vzorku byla spektrofotometricky stanovena koncentrace DNA (DS-11 Spectrophotometer, DeNovix, viz kapitola 3.3.10). Získaný roztok obsahující plazmidovou DNA byl uchován při teplotě -20°C .

3.3.4 Příprava plazmidu pET-21c(+)/p53-Histag

Nejprve bylo potřeba získat linearizovaný vektor pET-21c(+), aby do něj mohl být přenesen gen pro p53. V naší laboratoři byl pro expresi proteinu Bach1 využíván plazmid pET-21c(+)/Bach1-Histag, jenž má ověřenou nukleotidovou sekvenci a zavádí k proteinové sekvenci pomocný úsek několika histidinů, tzv. histidinovou kotvu, které se s výhodou využije při afinitní chromatografii během izolace proteinu p53. Pro získání linearizovaného vektoru pET-21c(+) byl štěpen právě tento plazmid. Do mikrozkuřavky Eppendorf bylo pipetováno 7 μ l sterilní deionizované vody, 2 μ l CutSmart pufru (0,5 M octan draselný; 0,2 M Tris-acetát; 0,1 M octan hořečnatý; 1 % BSA; pH 7,9), 0,5 μ l endonukleasy *NdeI*, 0,5 μ l endonukleasy *XhoI* a 10 μ l vektoru pET-21c(+)/Bach1-Histag (175 ng μ l⁻¹). Tato směs posléze inkubována po dobu 3 hodin při teplotě 37°C (Economy Incubator Size 1, Gallenkamp).

Gen pro protein p53 byl zakoupen prostřednictvím neziskové organizace Addgene ve formě transformovaných bakteriálních buněk lokalizovaných agarovém médiu (viz kapitola 3.3.2 a 3.3.3). Pro naší další práci bylo potřeba gen pro p53 („insert“)

z vektoru pLX313 získat pomocí metody PCR. Byly navrženy příslušné oligonukleotidové „primery“ (viz kapitola 3.2) pro amplifikaci genu p53 metodou PCR a jeho následný přenos do vektoru pET-21c(+). Do mikrozkušavky Eppendorf bylo pipetováno 32,5 μ l sterilní deionizované vody, 10 μ l pětkrát koncentrovaného pufru Phusion® HF (New England BioLabs), 1 μ l roztoku obsahující čtyři druhy deoxynukleosidtrifosfátů (10 μ M), 2,5 μ l „forward primeru“ (10 μ M), 2,5 μ l „reverse primeru“ (10 μ M), 1 μ l dvěstěkrát ředěného roztoku obsahující vektor pLX313-TP53-WT a 0,5 μ l Phusion® HF DNA polymerasy (New England BioLabs). Reakční směs byla na závěr promíchána v mikrozkušavce pomocí automatické pipety a byla umístěna do termocykleru (FTGENE2D Techgene, Techne). PCR byla provedena při podmínkách uvedených v Tabulce 1.

Tabulka 1. Nastavení parametrů termocykleru pro PCR.

Krok	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace DNA	98	60	1
Denaturace	98	10	
Nasedání „primerů“	63	20	35
Elongace	72	33	
Závěrečný krok elongace	72	480	1
Udržovací teplota	4	-	1

Linearizovaný plazmid pET-21c(+) a amplifikovaný gen pro p53 byly dále analyzovány pomocí horizontální agarosové elektroforézy (viz kapitola 3.3.5). Části agarosového gelu obsahující dané fragmenty (linearizovaný plazmid pET-21c(+) nebo gen pro p53) byly pomocí skalpelu odebrány z celého gelu a umístěny každý zvlášť do předem zvážených mikrozkušavek Eppendorf (ER-120A, A&D). Mikrozkušavky byly opětovně zváženy a z rozdílu hmotností před a po zvážení byla zjištěna hmotnost agarosového gelu obsahujícího dané fragmenty DNA. Izolace odpovídajících fragmentů DNA byla uskutečněna s pomocí komerčního kitu Monarch® DNA Gel Extraction Kit (New England BioLabs). Do mikrozkušavky Eppendorf byl přidán Monarch® Gel Dissolving Buffer (400 μ l na 100 mg agarosového gelu). Zkušavky byly inkubovány při teplotě 50 °C (LS1, VLM Labortechnik) a protřepávány na vibrační třepačce (ZX3, Velp Scientifica), dokud se agarosový gel zcela nerozpustil. Poté byla výsledná

směs přenesena na membránu kolony speciálních mikrozkmavek Monarch® DNA Cleanup Column (součást soupravy Monarch® DNA Gel Extraction Kit) a obsah mikrozkmavek byl podroben centrifugaci při laboratorní teplotě po dobu 1 minuty a 13200 RPM (5415 R, Eppendorf). Na kolonu bylo aplikováno 200 µl pufru Monarch® DNA Wash Buffer (součást soupravy Monarch® DNA Gel Extraction Kit) a byla provedena centrifugace za stejných podmínek jako v předešlém případě. Filtrát byl odstraněn, na kolonu bylo opět přidáno 200 µl téhož pufru a centrifugace byla zopakována. Poté byly kolony přemístěny do čistých mikrozkmavek Eppendorf. Těsně nad membránu bylo pomocí automatické pipety aplikováno 8 µl elučního pufru Monarch® DNA Elution Buffer (součást soupravy Monarch® DNA Gel Extraction Kit). Obsah mikrozkmavek byl ponechán 1 minutu inkubovat a následně byla provedena centrifugace při laboratorní teplotě po dobu 1 minuty a 13200 RPM (5415 R, Eppendorf). Na spektrofotometru DS-11 Spectrophotometer (DeNovix) byla v mikroobjemu stanovena koncentrace získané DNA (viz kapitola 3.3.10).

V dalším kroku byla provedena tzv. spojovací klonovací reakce (z anglického „In-Fusion Cloning Reaction“) s využitím soupravy Quick-Fusion Cloning Kit (Agilent). Na základě známých koncentrací byly linearizovaný vektor pET-21c(+) a produkt PCR (amplifikovaný gen pro p53) smíchány v optimálním molárním poměru (2 : 1). Do mikrozkmavky Eppendorf bylo pipetováno 3,4 µl linearizovaného vektoru pET-21c(+), 0,2 µl produktu PCR (amplifikovaného genu pro p53), 0,2 µl Fusion Enzyme (součást soupravy Quick-Fusion Cloning Kit) a 2 µl pětikrát koncentrovaného pufru Fusion Buffer (součást soupravy Quick-Fusion Cloning Kit) a 4,2 µl sterilní deionizované vody. Obsah mikrozkmavky byl ponechán 45 minut inkubovat při teplotě 37 °C (Economy Incubator Size 1, Gallenkamp). V mikroobjemu byla spektrofotometricky (DS-11 Spectrophotometer, DeNovix) stanovena koncentrace získané plazmidové DNA (viz kapitola 3.3.10). Tato plazmidová DNA byla později využita pro transformaci buněk *E. coli* DH5α (viz kapitola 3.3.6).

3.3.5 Horizontální elektroforéza na agarosovém gelu

Pro přípravu 1 % (*w/v*) agarosového gelu bylo v Erlenmeyerově baňce (100 ml) naváženo 0,4 g agarosu (440-35N, KERN). K navážené agarose bylo přidáno 40 ml Tris-acetát-EDTA (TAE) pufru (40 mM Tris-acetát, pH 8,2; 1 mM EDTA). Tato směs

byla zvážena a následně zahřívána v mikrovlnné troubě za občasného promíchání, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění agarosy. K roztoku byla přidána deionizovaná voda tak, aby opět dosáhl původní hmotnosti. Směs v baňce byla mírně ochlazená pod proudem tekoucí vody a do Erlenmeyerovy baňky byly přidány 4 µl 10000-krát koncentrovaného barviva SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). Směs byla krouživým pohybem baňky promíchána a přenesena do vany pro tuhnutí agarosového gelu a byl do ní vložen hřeben pro vytvoření jamek, do kterých budou aplikovány příslušné vzorky. Vana byla zakryta a ponechána stát 30 minut, dokud se nevytvořil agarosový gel. Vana s gelem byla po uplynutí této doby přemístěna do elektroforetické aparatury (multiSUB Mini, Cleaver Scientific) a aparatura byla naplněna TAE pufrem.

Nejprve bylo připraveno 6 µl standardu smícháním 1 µl markeru 2-log DNA ladder (New England BioLabs), 1 µl šestkrát koncentrovaného barviva Gel Loading Dye (New England Biolabs) a 4 µl deionizované vody. Vzorek linearizovaného vektoru pET-21c(+) byl připraven smícháním 4 µl šestkrát koncentrovaného barviva Gel Loading Dye (New England Biolabs) a 20 µl štěpící směsi. Vzorek PCR produktu byl připraven smícháním 5 µl šestkrát koncentrovaného barviva Gel Loading Dye (New England Biolabs) a 25 µl směsi získané po ukončení PCR. Vzorky byly poté s pomocí automatické pipety aplikovány do jamek gelu. Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji napětí nastaveném na 110 V (PowerPac Basic Power Supply, Bio-Rad) a probíhala 30 minut. Po ukončení elektroforézy byl agarosový gel přemístěn na transiluminátor (Dark Reader, Clare Chemical Research) pro zviditelnění jednotlivých fragmentů DNA a výsledek byl zaznamenán. Fragmenty separované pomocí agarosové elektroforézy pak byly dále využity dle postupu v kapitole 3.3.4.

3.3.6 Transformace buněk *E. coli* BL-21(DE3) a *E. coli* DH5α

Kompetentní buňky *E. coli* byly ponechány inkubovat na ledu. Poté byly přemístěny do laminárního boxu (BIO 126, Labox), kde bylo pomocí automatické pipety přeneseno 25 µl příslušných kompetentních buněk do dvou sterilních mikrozkušavek Eppendorf. K buňkám *E. coli* DH5α bylo do jedné mikrozkušavky přidáváno 10 µl produktu „In-Fusion“ reakce (viz kapitola 3.3.4). K buňkám *E. coli* BL-21(DE3)

bylo do jedné mikrozkušavky přidáváno 0,5 μ l plazmidu pET-21c(+)/p53-Histag. Druhá mikrozkušavka obsahovala v obou případech pouze 25 μ l kompetentních buněk a byla využita jako negativní kontrola. Buňky v mikrozkušavkách byly po sléze 15 minut inkubované na ledu. Po uplynutí této doby byly mikrozkušavky opět přemístěny zpět do laminárního boxu. Do všech mikrozkušavek bylo pipetováno 175 μ l LB média. Jejich obsah byl promíchán a pomocí automatické pipety byl nanesen na agarové plotny s obsahem antibiotika ampicilin (viz kapitola 3.3.1). Pomocí sterilní zahnuté skleněné tyčinky byly příslušné buňky rozprostřeny rovnoměrně po celém povrchu. Poté, co se buněčná suspenze vsákla, byly agarové plotny opatřeny víčkem a uzavřeny parafilmem. Byly následně umístěny dnem vzhůru do inkubátoru (Economy Incubator Size 1, Gallenkamp), kde byly inkubovány po dobu 16 hodin při teplotě 37 °C. Po uplynutí této doby byly umístěny do lednice, připravené k dalšímu použití.

Pro další pracovní postup bylo nutné „přeočkovat“ kolonie transformovaných buněk *E. coli* z agarové plotny do tekutého LB média. Byly vybrány dvě „průměrné“ kolonie. Do dvou 50ml zkumavek Falcon bylo v laminárním boxu (BIO 126, Labox) umístěno 5 ml LB média a 5 μ l ampicilinu (100 mg ml⁻¹). Vybrané kolonie transformovaných buněk *E. coli* byly pomocí sterilních dřevěných tyčinek přeneseny do zkumavek Falcon. Zkušavky byly inkubovány po dobu 16 hodin při teplotě 37 °C a 200 RPM na orbitální třepače (Incubator Shaker, BT Lab Systems). V případě buněk *E. coli* DH5 α byly po inkubaci ze zkumavek asepticky vyjmuty dřevěné tyčinky a následovala centrifugace po dobu 10 minut při teplotě 20 °C a 4500 RPM (Z383K, HERMLE). Dalším krokem práce s buňkami *E. coli* DH5 α byla izolace plazmidové DNA pET-21c(+)/p53-Histag (viz kapitola 3.3.3). Po inkubaci transformovaných buněk *E. coli* BL-21(DE3) byla buněčná suspenze přenesena do TB média pro následnou expresi proteinu p53 (viz kapitola 3.3.7).

3.3.7 Exprese proteinu p53 v buňkách *E. coli* BL-21(DE3)

K sterilnímu TB médiu (celkový objem 8 l) v šestnácti Erlenmeyerových baňkách bylo asepticky pomocí automatické pipety přidáno po 0,5 ml ampicilinu (100 mg ml⁻¹) a 0,5 ml suspenze buněk *E. coli* BL-21(DE3) transformovaných plazmidem pET-21c(+)/p53-Histag (viz kapitola 3.3.6). Obsah všech šestnácti baňek byl inkubován

v orbitálních třepačkách (Multitron Pro, INFORS HT a Multitron Standard, INFORS HT) při teplotě 37 °C a rychlosti 180 RPM. Inkubace probíhala do doby, dokud se hodnota optické denzity buněk, OD₆₀₀, nenacházela v rozmezí od 0,6 do 1,2. Po odebrání reprezentativního vzorku suspenze buněk z Erlenmeyerovy baňky byla změřena optická denzita na spektrofotometru DS-11 Spectrophotometer (DeNovix) s použitím metody „OD600“. Poté, co bylo dosaženo požadované hodnoty optické denzity, byla snížena teplota inkubace jednak na 15 °C (pro osm z šestnácti baňek), jednak na 25 °C (pro zbylých osm baňek) a baňky byly ponechány 30 minut zchladit. V následujícím kroku bylo odebrán vzorek před indukcí exprese pro SDS elektroforézu (viz kapitola 3.3.9). Exprese proteinu p53 byla indukována přidáním 0,1 ml IPTG (0,5 M) do každé Erlenmeyerovy baňky. Rychlost otáček obou orbitálních třepaček byla snížena na 120 RPM, osm baňek bylo inkubováno při teplotě 15 °C a druhých osm baňek při teplotě 25 °C po dobu 16 hodin. Po uplynutí uvedeného času byly odebrány dva vzorky pro SDS elektroforézu (jeden vzorek pro teplotu 15 °C a druhý pro teplotu 25 °C, viz kapitola 3.3.9). Exprese proteinu p53 byla posléze ukončena centrifugací po dobu 45 minut při teplotě 4 °C a 3000 RPM (Janetzki K70D). Získané buňky byly zváženy a byly uchovány ve zkumavkách Falcon při –80 °C pro další využití.

3.3.8 Izolace proteinu p53 z buněk *E. coli* BL-21(DE3)

Buňky obsahující protein p53 byly inkubovány za laboratorní teploty přibližně 20 minut. Do připraveného resuspendačního pufru (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 0,2 mg ml⁻¹ lysozym) byly přidány inhibitory proteas (cOmplete™ ULTRA Tablets). V resuspendačním pufru byly zvlášť resuspendovány buňky, které exprimovaly protein p53 při teplotě 15 °C a 25 °C (viz kapitola 3.3.7), na 5 g buněk bylo použito přibližně 25 ml resuspendačního pufru. Jednotlivé suspenze byly převedeny do dvou kádinek (v závislosti na teplotě, při které byla provedena exprese proteinu p53) a za stálého míchání na magnetické míchačce (KMO2 basic, IKA) a chlazení na ledu byly podrobeny ultrazvukové sonikaci (Sonoplus HD 3100, sonda KE 76, Bandelin) za účelem porušení buněčných membrán. Pro každou suspenzi byla sonikace provedena celkem šestkrát po dobu 1 minuty při amplitudě 55 %. Mezi jednotlivými cykly byla rovněž ponechána jednominutová

přestávka, aby nedocházelo k přehřívání suspenze. Obsah každé kádinky byl následně převeden do dvou centrifugačních kyvet a do jedné z nich bylo přidáno 700 μ l roztoku obsahujícího DNasu I (Sigma-Aldrich, 1 mg ml⁻¹). Ve dvou kyvetách se tedy nacházela suspenze lyzovaných buněk, které exprimovaly protein p53 při teplotě 15 °C, z nichž jedna obsahovala DNasu I a druhá nikoliv. Ve zbylých dvou kyvetách se obdobně nacházela suspenze lyzovaných buněk, ovšem těch, které exprimovaly protein p53 při teplotě 25 °C a rovněž jedna kyveta obsahovala DNasu I, zatímco druhá ne. Následovala ultracentrifugace po dobu 1 hodiny při teplotě 4 °C a 45000 RPM (Beckman Optima™ LE-80K, rotor 45Ti). Po ukončení ultracentrifugace byly ze supernatantů odebrány celkem čtyři vzorky pro SDS elektroforézu. Rovněž z pelet byly odebrány vzorky pro následnou analýzu SDS elektroforézou (viz kapitola 3.3.9).

V následujícím kroku izolace proteinu p53 byla provedena afinitní chromatografie. Do dvou zkumavek Falcon (15 ml) byly umístěny 3 ml afinitního nosiče (TALON® Metal Affinity Resin). Afinitní nosič byl posléze ekvilibrován (2 minuty; 4 °C; 750 RPM; Z383K, HERMLE). Po centrifugaci byl odstraněn roztok nad nosičem, do zkumavky bylo přidáno 5 ml ekvilibračního pufru (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl), suspenze byla jemně promíchána a opět byla provedena centrifugace za stejných podmínek. Tento postup byl ještě dvakrát zopakován, pokaždé s použitím 5 ml nového ekvilibračního pufru. Po poslední centrifugaci byl však roztok nad nosičem ponechán a obsah zkumavky byl jemně promíchán tak, aby vznikla homogenní suspenze. Jednotlivé supernatanty z ultracentrifugace byly umístěny do čtyř plastových láhví. Do každé láhve bylo přidáno přibližně stejné množství ekvilibrovaného afinitního nosiče. Všechny čtyři láhve byly posléze uzavřeny parafilmem a inkubovány po dobu 1 hodiny při teplotě 4 °C za pravidelného míchání. Mezitím byly čisté chromatografické kolony s fritou promyty přibližně 100 ml deionizované vody. Po skončení inkubace byly obsahy plastových láhví převedeny na jednotlivé chromatografické kolony a pomalým odkapáváním byly ponechány protéct. Z roztoků, které neinteragovaly s afinitním nosičem, byly odebrány čtyři vzorky pro SDS elektroforézu (viz kapitola 3.3.9). Afinitní nosič interagující s histidinovou kotvou izolovaného proteinu p53 byl promyt přibližně 50 ml ekvilibračního pufru. Na kolony bylo poté aplikováno po 15 ml elučního pufru (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl; 200 mM imidazol). Eluáty o objemu 13 ml byly zachyceny do zkumavek Fal-

con (15 ml) a z nich byly odebrány čtyři vzorky pro SDS elektroforézu (viz kapitola 3.3.9). Eluáty získané z buněk, které exprimovaly protein p53 při stejné teplotě, byly spojeny dohromady. Dále jsme tedy pracovali pouze se dvěma roztoky, které se lišily v tom, při jaké teplotě byl exprimován protein p53 v daných buňkách (viz kapitola 3.3.7). Získané eluáty byly přeneseny do zkumavek Millipore obsahujících membránu, která je schopná zadržet proteiny s molekulovou hmotností vyšší než 30 kDa. Tyto zkumavky byly předem promyty přidáním ekvilibračního pufru a centrifugací po dobu 15 minut při teplotě 4 °C a 3000 RPM (Z383K, HERMLE). Eluáty v těchto zkumavkách byly opakovanou centrifugací po dobu 2 minut při teplotě 4 °C a 3000 RPM (Z383K, HERMLE) koncentrovány, dokud výsledný objem nedosáhl přibližně 500 µl.

Získané vzorky byly posléze purifikovány pomocí gelové permeační chromatografie na FPLC stanici (ÄKTApriTM plus, GE Healthcare). Byla použita kolona Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) a jako mobilní fáze byl použit roztok obsahující 20 mM Tris a 150 mM NaCl. Průtok byl nastaven na 0,8 ml min⁻¹ a dávkováno bylo 500 µl roztoku získaného aplikací afinitní chromatografie (viz odstavec výše). Pomocí spektrofotometrické detekce byla zaznamenávána absorbance při vlnové délce 280 nm. Na základě absorpčního profilu separovaných složek byly odebrány frakce obsahující protein p53. Za stejných podmínek byla provedena aplikace druhého vzorku na kolonu a po eluci byly opět odebrány frakce obsahující protein p53. Frakce z obou aplikací na kolonu byly spojeny dohromady a umístěny do zkumavky Millipore. Opakovanou centrifugací po dobu 2 minut při teplotě 4 °C a 3000 RPM (Z383K, HERMLE) byl objem výsledného produktu snížen přibližně na 500 µl. Byla změřena jeho koncentrace (viz kapitola 3.3.10) a byl odebrán vzorek pro SDS elektroforézu (viz kapitola 3.3.9). Výsledný produkt byl posléze rozdělen do alikvotů o objemu 50 µl, které byly zmrazeny pomocí tekutého dusíku a uchovány při teplotě -80 °C.

3.3.9 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)

Nejprve byla sestavena aparatura pro elektroforézu (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad) a do ní byla upevněna skla pro přípravu dvou polyakrylamidových gelů o tloušťce 1 mm, skla byla předem odmaštěna ethanolem. V kádince byl při-

praven roztok pro vznik 10 % (*w/v*) separačního gelu smícháním 6,7 ml pufru A (0,375 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1 % (*w/v*) SDS), 3,3 ml polymerizačního roztoku A (30 % (*w/v*) akrylamid; 0,8 % (*w/v*) bisakrylamid v pufru A), 10 μ l TEMED a 100 μ l peroxodisíranu amonného (100 mg ml⁻¹). Po rychlém promíchání v kádince byl roztok aplikován pomocí automatické pipety do prostoru mezi skly a poté byl převrstven deionizovanou vodou. Roztok byl ponechán 30 minut inkubovat s cílem získat polyakrylamidový gel. Po uplynutí uvedené doby byla odstraněna deionizovaná voda. Následně byl v kádince připraven roztok pro vznik 4 % (*w/v*) zaostřovacího gelu smícháním 2,6 ml pufru B (0,125 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1 % (*w/v*) SDS), 400 μ l polymerizačního roztoku B (30 % (*w/v*) akrylamid; 0,8 % (*w/v*) bisakrylamid v pufru B), 3 μ l TEMED a 60 μ l peroxodisíranu amonného (100 mg ml⁻¹). Po rychlém promíchání byl roztok aplikován do prostoru mezi skly nad separační gel. Do roztoku pro vznik zaostřovacího gelu byl vložen hřeben pro vytvoření jamek, do kterých budou posléze aplikovány zkoumané vzorky. Po vzniku zaostřovacího gelu byla skla přemístěna do elektroforetické vany. Prostor mezi dvojicí skel i samotná elektroforetická vana byly naplněny elektrodovým pufrem (25 mM Tris, pH 8,3; 0,192 M glycin; 0,1 % (*w/v*) SDS).

Vzorky odebrané v průběhu předchozí práce (viz kapitola 3.3.7 a 3.3.8) byly smíchány se čtyřikrát koncentrovaným vzorkovým pufrem (0,25 M Tris-HCl, pH 6,8; 8 % (*w/v*) SDS; 40 % (*v/v*) glycerol, 20 % *v/v* 2-merkaptoethanol; 0,004 % (*w/v*) bromfenolová modř) a deionizovanou vodou (viz Tabulka 2, strana 49). Tyto vzorky byly inkubovány v suché lázni po dobu 5 minut při teplotě 100 °C (Mini Dry Bath, MD-MINI, Major Science). Posléze byly krátce centrifugovány (Gilson, GmC Lab). Ze zaostřovacího gelu byl odstraněn hřeben a do jamek byly aplikovány jednotlivé vzorky a standard (Precision Plus Protein™ Standards). Elektroforetická vana byla uzavřena a připojena ke zdroji elektrického napětí (PowerPac Basic Power Supply, Bio-Rad), elektroforéza probíhala 70 minut při napětí 200 V. Po skončení elektroforézy byly gely přemístěny do barvicí lázně (InstantBlue™ Protein Stain, Sigma Aldrich) na dobu 1 hodiny. Následně byla barvicí lázeň vyměněna za deionizovanou vodu, ve které byly gely ponechány 16 hodin. Výsledné gely byly zaznamenány pro pozdější vyhodnocení. Intenzita jednotlivých proteinových pruhů byla měřena programem ImageJ.

Tabulka 2. Složení vzorků pro SDS elektroforézu. Do jamek gelu bylo aplikováno vždy 10 μl těchto vzorků s výjimkou eluátu v elučním pufru po afinitní chromatografii, kterého bylo aplikováno 15 μl . Všechny vzorky, kromě buněk před indukcí IPTG a výsledného roztoku obsahující protein p53, byly paralelně připraveny ve dvou variantách. Jedna varianta byla odebírána z buněk, které exprimovaly protein p53 při 15 °C a druhá z buněk, které exprimovaly protein p53 při 25 °C. Výsledného roztoku s proteinem p53 bylo poté do jedné jamky aplikováno 10 μl a do druhé 5 μl .

Vzorek	Objem vzorku (μl)	Objem vzorkového pufru (μl)	Objem deionizované vody (μl)
Buňky před indukcí IPTG	10	10	20
Buňky po indukcí IPTG	10	10	20
Supernatant po ultracentrifugaci (s DNasou I)	10	10	20
Supernatant po ultracentrifugaci (bez DNasy I)	10	10	20
Peleta po ultracentrifugaci (s DNasou I)	*	10	30
Peleta po ultracentrifugaci (bez DNasy I)	*	10	30
Eluát v ekvilibračním pufru po afinitní chromatografii (s DNasou I)	10	10	20
Eluát v ekvilibračním pufru po afinitní chromatografii (bez DNasy I)	10	10	20
Eluát v elučním pufru po afinitní chromatografii (s DNasou I)	30	10	0
Eluát v elučním pufru po afinitní chromatografii (bez DNasy I)	30	10	0
Výsledný roztok obsahující protein p53	10	10	20

* pevný vzorek pelety byl odebrán pomocí špachtle

3.3.10 Spektrofotometrické stanovení koncentrace plazmidové DNA a proteinu

Stanovení koncentrace plazmidové DNA i proteinu bylo provedena v mikroobjemu s použitím přístroje DS-11 Spectrophotometer (DeNovix). Pro stanovení koncentrace plazmidové DNA bylo využito metody „dsDNA“. Na detekční plochu bylo aplikováno 2,5 μl „slepého“ vzorku (tzv. blank), jímž byla deionizovaná voda. Po jeho proměření bylo na detekční plochu aplikováno 2,5 μl měřeného vzorku, v němž byla stanovena koncentrace dvouřetězcové DNA. K určení koncentrace DNA využívá přístroj následujícího vztahu:

$$c = \frac{A_{260} \cdot \text{CF}}{l}, \quad (3.1)$$

kde c je hmotnostní koncentrace plazmidové DNA v roztoku ($\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$), A_{260} je absorbance při 260 nm, CF je přepočítávací faktor pro dvouřetězcovou DNA (hodnota udaná výrobcem $\text{CF} = 50 \text{ ng cm } \mu\text{l}^{-1}$) a l je tloušťka absorpčního prostředí (v případě daného měření $l = 0,05 \text{ cm}$).

Pro stanovení koncentrace proteinu p53 ve finálním preparátu (viz kapitola 3.3.8) bylo využito metody „Protein A280“. Na detekční plochu bylo stejně jako v předchozím případě aplikováno 2,5 μl „slepého“ vzorku (tj. deionizované vody) a po jeho proměření bylo aplikováno 2,5 μl měřeného vzorku obsahujícího protein p53. K určení koncentrace proteinu v roztoku využívá přístroj následujícího vztahu:

$$c = \frac{A_{280} \cdot M}{\varepsilon_{280} \cdot l}, \quad (3.2)$$

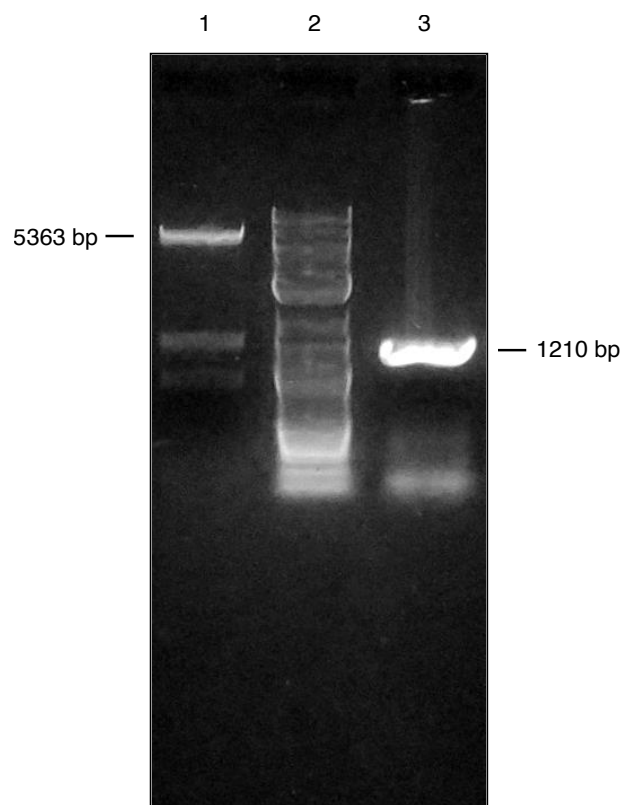
kde c je hmotnostní koncentrace daného proteinu v roztoku (mg ml^{-1}), A_{280} je absorbance při 280 nm, M je molekulová hmotnost daného proteinu (pro protein p53 byla použita hodnota $M = 43712 \text{ g mol}^{-1}$ [91]), ε_{280} je molární absorpční koeficient daného proteinu pro vlnovou délku 280 nm (pro protein p53 byla použita hodnota $\varepsilon_{280} = 36035 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [92]) a l je tloušťka absorpčního prostředí (v případě daného měření $l = 0,05 \text{ cm}$).

4 Výsledky

4.1 Příprava plazmidu pET-21c(+)/p53-Histag

Plazmid pLX313-TP53-WT obsahující gen pro p53 bylo nejprve nutné izolovat z bakteriálních buněk. Bylo provedeno očkování bakteriálních kolonií z bakteriálního vpichu na agarovou plotnu s ampicilinem. Plazmid pLX313-TP53-WT v sobě obsahuje gen zprostředkovávající rezistenci vůči ampicilinu. Důležitou skutečností bylo to, že na agarové plotně s obsahem právě tohoto antibiotika, kam byly aplikovány buňky zaslané dodavatelem, byl pozorován výskyt bakteriálních kolonií (data neuvedena). Po očkování těchto kolonií do tekutého LB média bylo úspěšně provedeno namnožení a posléze izolace plazmidu pLX313-TP53-WT (viz kapitola 3.3.3). Hmotnostní koncentrace získaného plazmidu pLX313-TP53-WT v roztoku byla $485 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ a poměr absorbance tohoto roztoku při 260 nm ku absorbanci při 280 nm ($A_{260/280}$), udávající míru čistoty plazmidové DNA, činil 1,91.

Další krok spočíval v přenosu genu pro protein p53 z plazmidu pLX313-TP53-WT do vektoru pET-21c(+). Byly navrženy příslušné „primery“ (viz kapitola 3.2) a pomocí metody PCR byl namnožen gen kódující protein p53 (viz kapitola 3.3.4). Prostřednictvím restričních endonukleas (*NdeI* a *XhoI*) byl linearizován vektor pET-21c(+) a zároveň z něj byl odstraněn původní gen kódující protein Bach1 (viz kapitola 3.3.4). Linearizovaný vektor pET-21c(+) (5363 bp) a namnožený gen pro protein p53 (1210 bp) byly identifikovány s pomocí horizontální elektroforézy na agarosovém gelu (viz Obrázek 10, strana 52).



Obrázek 10. Identifikace linearizovaného vektoru pET-21c(+) a amplifikovaného genu pro protein p53 pomocí horizontální elektroforézy na agarosovém gelu. Dráha 1: vzorek linearizovaného vektoru pET-21c(+) štěpeného pomocí restrikčních endonukleas *NdeI* a *XhoI*, délka linearizovaného vektoru činí 5363 párů bází (bp); dráha 2: marker 2-log DNA Ladder; dráha 3: vzorek genu pro protein p53 amplifikovaného pomocí metody PCR, délka PCR produktu činí 1210 bp.

Části agarosového gelu, které obsahovaly úseky odpovídající výše popsaným fragmentům DNA, byly odebrány z agarosového celku pomocí skalpelu. Hmotnost odebraného agarosového gelu obsahujícího linearizovaný vektor pET-21c(+) činila 67,1 mg a hmotnost odebraného agarosového gelu obsahujícího amplifikovaný gen pro protein p53 činila 94,1 mg. Oba tyto fragmenty byly úspěšně extrahovány z agarosového gelu. Hmotnostní koncentrace linearizovaného vektoru pET-21c(+) v roztoku činila $15,8 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ a poměr absorbancí, $A_{260/280}$, byl 1,68. Hmotnostní koncentrace amplifikovaného genu pro protein p53 v roztoku činila $120,0 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ a poměr absorbancí, $A_{260/280}$, byl 1,87.

Provedením tzv. spojovací klonovací reakce (z anglického „In-Fusion cloning reaction“) bylo docíleno ligace genu pro protein p53 a vektoru pET-21c(+) za vzniku plazmidu pET-21c(+)/p53-Histag. Tímto plazmidem byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* DH5 α . Tyto buňky byly kultivované na agarové plotně s ampicili-

nem. Na agarové plotně obsahující ampicilin nebyly pozorovány žádné kolonie, pokud byly aplikovány buňky *E. coli* DH5 α bez transformace plazmidem pET-21c(+)/p53-Histag. Jakmile však byly aplikovány transformované buňky *E. coli* DH5 α plazmidem pET-21c(+)/p53-Histag, po přibližně 16 hodinách inkubace byly na povrchu agarové plotny s ampicilinem pozorovatelné kolonie transformovaných buněk, které měly rezistenci proti danému antibiotiku (data neukázána).

Provedením tzv. spojovací klonovací reakce (z anglického „In-Fusion cloning reaction“) bylo docíleno ligace genu pro protein p53 a vektoru pET-21c(+) za vzniku plazmidu pET-21c(+)/p53-Histag. Tímto plazmidem byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* DH5 α . Tyto buňky byly kultivované na agarové plotně s ampicilinem. Na agarové plotně obsahující ampicilin nebyly pozorovány žádné kolonie, pokud byly aplikovány buňky *E. coli* DH5 α bez transformace plazmidem pET-21c(+)/p53-Histag. Jakmile však byly transformovány buňky *E. coli* DH5 α plazmidem pET-21c(+)/p53-Histag, po přibližně 16 hodinách inkubace byly na povrchu agarové plotny s ampicilinem pozorovatelné kolonie transformovaných buněk, které měly rezistenci proti danému antibiotiku (data neuvedena).

Z těchto kolonií byly vybrány čtyři, které byly dále kultivované v LB médiu (viz kapitola 3.3.6). Z těchto buněk byl dále izolován plazmid pET-21c(+)/p53-Histag dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.3. Byly získány čtyři vzorky obsahující daný plazmid o následujících koncentracích a poměrech absorbancí: vzorek 1 – 108 ng μl^{-1} , $A_{260/280} = 2,00$; vzorek 2 – 126 ng μl^{-1} , $A_{260/280} = 2,05$; vzorek 3 – 163 ng μl^{-1} , $A_{260/280} = 2,00$ a vzorek 4 – 112 ng μl^{-1} , $A_{260/280} = 2,04$.

Kontrola správnosti provedené spojovací klonovací reakce a potvrzení, že v genu pro protein p53 nedošlo k nežádoucím mutacím bylo provedeno v externí laboratoři (OMICS Genomika, BIOCEV). Na základě vyhodnocení zjištěné sekvence nukleotidů v daných preparátech (data neuvedena) bylo potvrzeno, že získané vzorky plazmidové DNA mohou být využity k dalšímu postupu.

4.2 Exprese proteinu p53 a optimalizace tohoto procesu

Ze získaných vzorků plazmidu pET-21c(+)/p53-Histag byl pro následující práci vybrán vzorek 3 obsahující plazmidovou DNA o nejvyšší koncentraci, tedy $163 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$. Plazmidovou DNA byly transformovány buňky *E. coli* BL-21(DE3) (viz kapitola 3.3.6). Také pro buňky *E. coli* BL-21(DE3) bylo ověřeno, že pokud nejsou transformovány plazmidem pET-21c(+)/p53-Histag, nemají rezistenci k antibiotiku ampicilin (data neukázána). Této vlastnosti buněk pak bylo využito k selekci těch kolonií *E. coli* BL-21(DE3), u kterých byla transformace plazmidem pET-21c(+)/p53-Histag úspěšná. Tyto transformované buňky byly očkovány do 8 l TB (šestnáct Erlenmeyerových baněk) média s ampicilinem. Po přibližně 4 hodinách inkubace, kdy OD_{600} dosáhla hodnoty 1,2, byla přerušena inkubace a k buňkám bylo přidáno IPTG pro indukci exprese proteinu p53 (dle postupu viz kapitola 3.3.7).

Zároveň s cílem optimalizace exprese byl obsah osmi z šestnácti Erlenmeyerových baněk (4 l média) obsahujících bakterie exprimující protein p53 inkubován při teplotě 25°C oproti běžným 15°C , při kterých probíhala exprese proteinu p53 v dalších osmi Erlenmeyerových baňkách (další 4 l média). Detailní postup je uveden v kapitole 3.3.7. Po 16 hodinách byla exprese proteinu ukončena a získané buňky byly váženy. Z objemu 4 l TB média inkubovaného při teplotě 15°C bylo získáno 19,6 g buněk, což činí 4,9 g buněk na 1 l TB média. Z objemu 4 l TB média inkubovaného při teplotě 25°C bylo získáno 20,9 g buněk, což činí 5,2 g buněk na 1 l TB média. Pozorováním drah 2 a 3 na Obrázcích 13 a 14 (strana 58 a 59) je patrné, že při obou teplotách exprese proteinu p53, je v dráze 3 (tj. vzorek buněk po indukci exprese pomocí IPTG) pozorovatelný protein s podobnou mobilitou jako standard o molekulové hmotnosti 50 kDa. Intenzita pruhu daného proteinu svědčí o tom, že je tohoto proteinu výrazně více v případě exprese uskutečněné při 25°C než v případě exprese při 15°C .

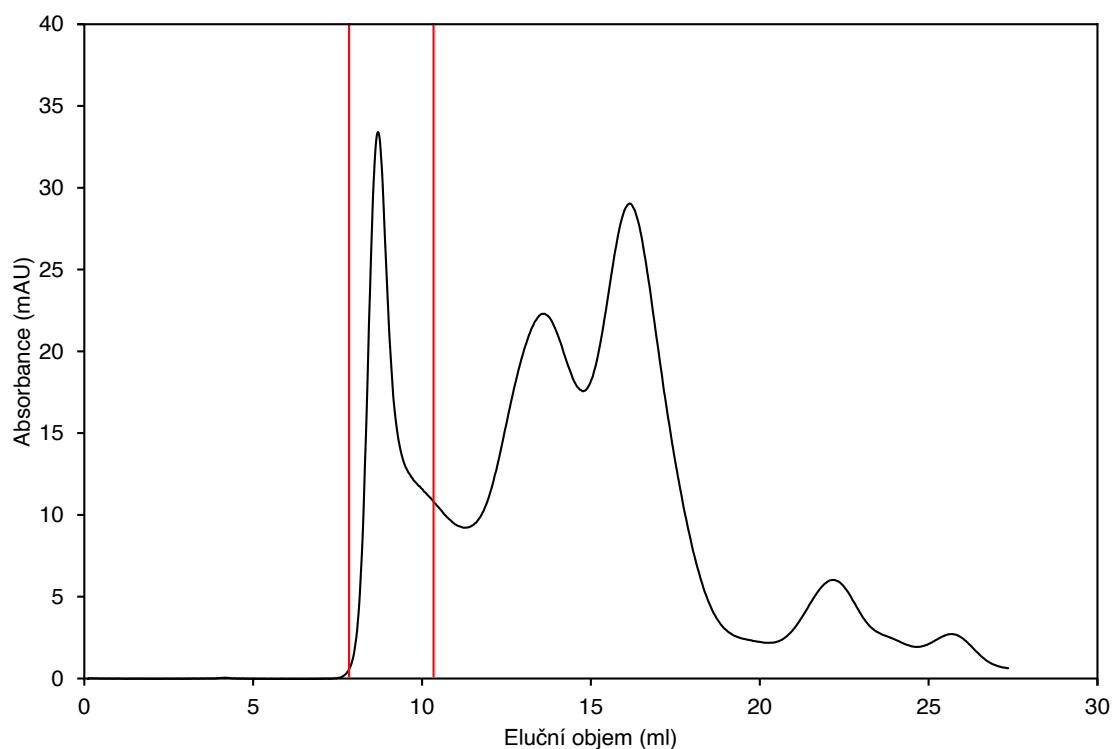
4.3 Izolace proteinu p53 v jeho „apoformě“

Dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.8 byla provedena izolace proteinu p53 v jeho „apoformě“. S cílem optimalizace, nejen exprese (viz kapitola 3.3.7), ale také izolač-

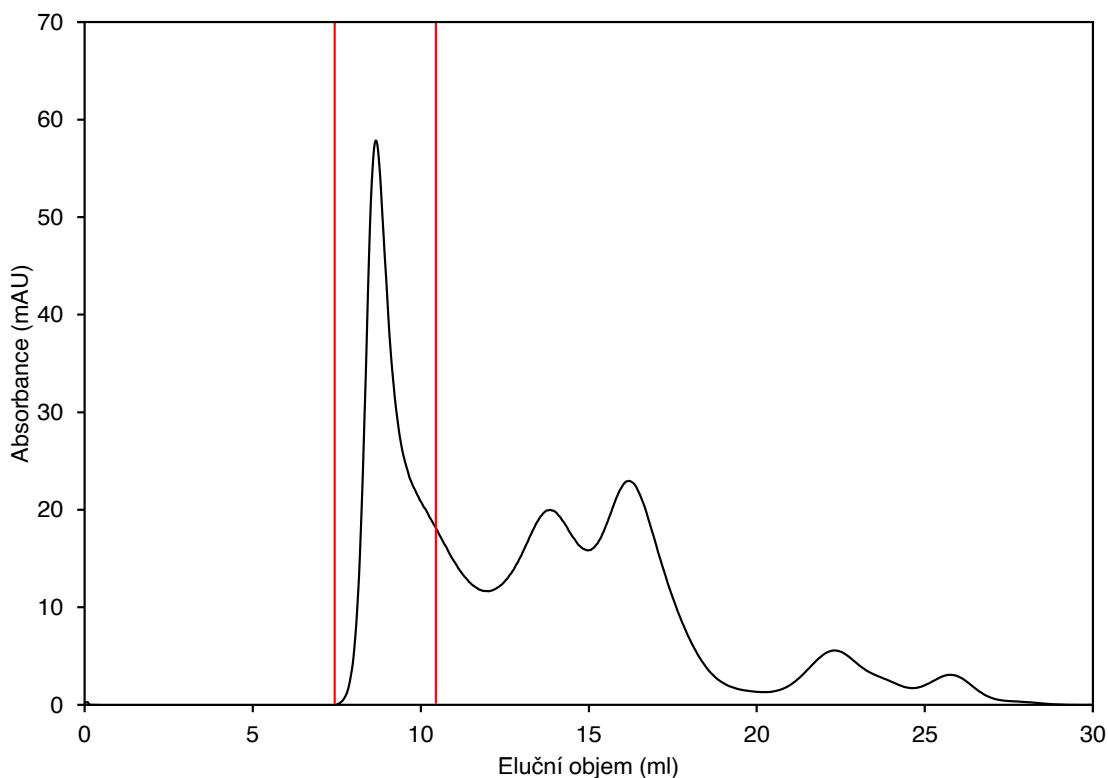
ního postupu, byla před provedením ultracentrifugace přidána do části preparátů DNasa I. Tato modifikace izolačního postupu pak byla hodnocena pomocí analýzy vzorků odebraných během jednotlivých izolačních kroků metodou SDS-PAGE (Obrázky 13 a 14, strana 58 a 59). Výsledky této optimalizační strategie jsou uvedeny níže, až za rozborem výsledků jednotlivých standardních izolačních kroků.

Prvním krokem celého izolačního procesu bylo narušení buněk sonikací a následná ultracentrifugace. Z Obrázků 13 a 14 je patrné, že v drahách 6 a 7, které obsahují vzorek pelety po ultracentrifugaci, je stále velký obsah proteinu s podobnou molekulovou hmotností jako p53, tj. 50 kDa. Tento obsah je ještě vyšší u vzorků buněk, které exprimovaly protein p53 při 25 °C. Nicméně tento protein je přítomný i ve všech získaných cytosolárních frakcích (Obrázky 13 a 14, dráhy 4 a 5). Jedním z hlavních izolačních kroků byla afinitní chromatografie, která byla podmíněna přítomností histidinové kotvy v sekvenci exprimovaného konstruktu proteinu p53 (Obrázky 13 a 14, dráhy 8, 9, 10 a 11). Je třeba poukázat na to, že ve vzorku směsi, která s afinitním nosičem neinteragovala, je patrná přítomnost proteinu o molekulové hmotnosti odpovídající proteinu p53 (Obrázky 13 a 14, dráhy 8 a 9). V těchto preparátech je však také velké množství balastních proteinů. Hlavně je důležité, že na Obrázcích 13 a 14 v drahách 10 a 11 lze jasně pozorovat významné nabohacení daných preparátů proteinem s molekulovou hmotností odpovídající 50 kDa jako výsledek afinitně chromatografického purifikačního kroku.

Poté byl protein p53 dále purifikován s pomocí gelové permeační chromatografie. Při první aplikaci na kolonu byl nanesen preparát získaný expresí v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) při teplotě 15 °C. Z dřívějších experimentů, které spočívaly v analýze jednotlivých frakcí získaných gelovou permeační chromatografií pomocí metody SDS-PAGE, jsme ověřili, že elektroforetické mobility odpovídající mobilitě standardu s molekulovou hmotností 50 kDa odpovídá frakce eluovaná za daných podmínek gelovou permeační chromatografií v elučním objemu přibližně 9 ml (data neuvedena). Proto byly odebrány frakce eluované v objemu 7,8–10,3 ml (viz Obrázek 11, strana 56). Při druhé aplikaci na kolonu byl nanesen preparát získaný expresí z buněk *E. coli* BL-21(DE3) při teplotě 25 °C. Z této aplikace vzorku na kolonu byly odebrány frakce eluované v objemu 7,4–10,5 ml (viz Obrázek 12, strana 57).

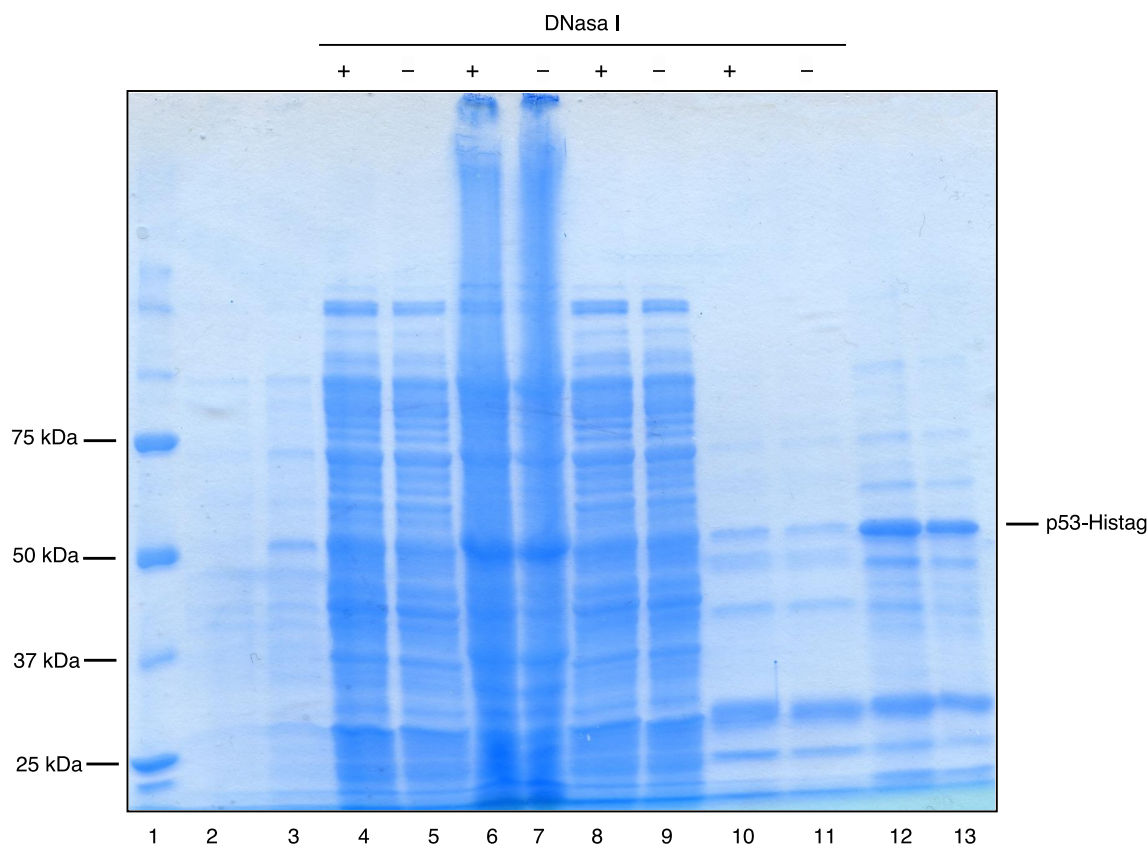


Obrázek 11. Záznam z gelové permeační chromatografie provedené při purifikaci proteinu p53 izolovaného z buněk *E. coli* BL-21(DE3), které exprimovaly protein p53 při teplotě 15 °C. Červeně je vyznačen úsek, při kterém docházelo k eluci proteinu p53 (eluční objem 7,8–10,3 ml), z tohoto úseku byly odebrány frakce, které byly dále analyzovány.

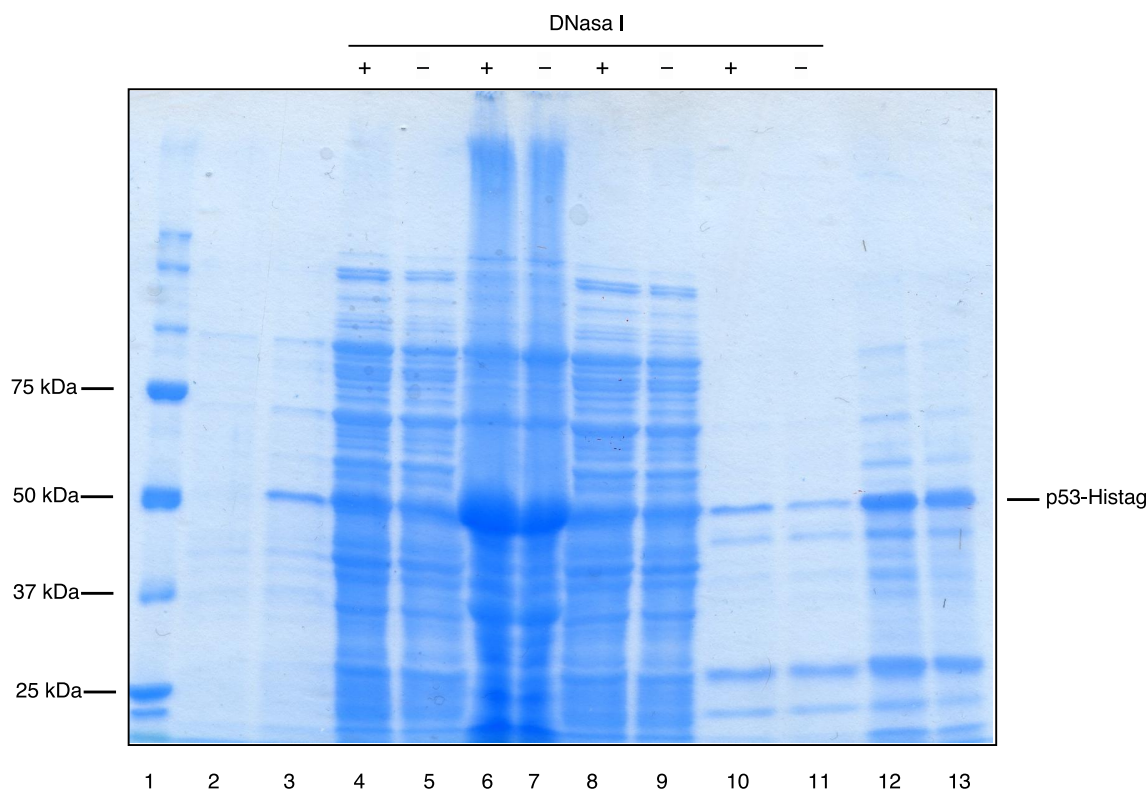


Obrázek 12. Záznam z gelové permeační chromatografie provedené při purifikaci proteinu p53 izolovaného z buněk *E. coli* BL-21(DE3), které exprimovaly protein p53 při teplotě 25 °C. Červeně je vyznačen úsek, při kterém docházelo k eluci proteinu p53 (eluční objem 7,4-10,5 ml), z tohoto úseku byly odebrány frakce, které byly dále analyzovány.

V průběhu izolace a purifikace proteinu p53 byly odebírány vzorky, které byly následně analyzovány s pomocí SDS elektroforézy (postup a přesné složení analyzovaných vzorků viz kapitola 3.3.9). Vzorky byly odebírány pro obě paralelní izolace z buněk exprimujících protein p53 při teplotě 15 °C (Obrázek 13, strana 58) a 25 °C (Obrázek 14, strana 59) a dále byly rovněž analyzovány vzorky obsahující a neobsahující enzym DNasu I. Z této analýzy není patrný výrazný rozdíl mezi příslušným krokem provedeným v přítomnosti nebo v absenci DNasy I (Obrázky 13 a 14). Na druhou stranu je možno pozorovat mírně vyšší intenzitu pruhu, který odpovídá proteinu s elektroforetickou mobilitou 50 kDa proteinu v drahách 10 na Obrázku 13 a pak na Obrázku 14 zvláště v porovnání s intenzitou tohoto signálu v drahách sousedních tj. v drahách 11 stejných obrázků. Do drah 12 a 13 Obrázků 13 a 14 byl aplikován výsledný preparát obsahující protein p53, bylo nanášeno 10 a 5 μ l získaného preparátu v tomto pořadí.



Obrázek 13. Snímek z gelu po provedení SDS elektroforézy vzorků odebraných během exprese a izolace proteinu p53 v jeho „apoformě“. V drahách 3-11 se nachází vzorky z buněk exprimujících protein p53 při teplotě 15 °C. Dráha 1: marker Precision Plus Protein™ Unstained Standards; dráha 2: buňky *E. coli* BL-21(DE3) před indukcí IPTG; dráha 3: buňky *E. coli* BL-21(DE3) po indukci IPTG; dráha 4: supernatant po ultracentrifugaci s přítomnou DNasou I; dráha 5: supernatant po ultracentrifugaci bez DNasy I; dráha 6: peleta po ultracentrifugaci s přítomnou DNasou I; dráha 7: peleta po ultracentrifugaci bez DNasy I; dráha 8: eluát po afinitní chromatografii v ekvilibračním pufru s přítomnou DNasou I, dráha 9: eluát po afinitní chromatografii v ekvilibračním pufru bez DNasy I; dráha 10: eluát po afinitní chromatografii v elučním pufru s přítombou DNasou I; dráha 11: eluát po afinitní chromatografii v elučním pufru bez DNasy I; dráha 12: výsledný produkt proteinu p53 v jeho „apoformě“ (pro přípravu vzorku použito 10 µl výsledného produktu); dráha 13: výsledný produkt proteinu p53 v jeho „apoformě“ s histidinovou kotvou (pro přípravu vzorku použito 5 µl výsledného produktu).



Obrázek 14. Snímek z gelu po provedení SDS elektroforézy vzorků odebraných během exprese a izolace proteinu p53 v jeho „apoformě“. V drahách 3-11 se nachází vzorky z buněk exprimujících protein p53 při teplotě 25 °C. Dráha 1: marker Precision Plus Protein™ Unstained Standards; dráha 2: buňky *E. coli* BL-21(DE3) před indukcí IPTG; dráha 3: buňky *E. coli* BL-21(DE3) po indukci IPTG; dráha 4: supernatant po ultracentrifugaci s přítomnou DNasou I; dráha 5: supernatant po ultracentrifugaci bez DNasy I; dráha 6: peleta po ultracentrifugaci s přítomnou DNasou I; dráha 7: peleta po ultracentrifugaci bez DNasy I; dráha 8: eluát po afinitní chromatografii v ekvilibračním pufru s přítomnou DNasou I, dráha 9: eluát po afinitní chromatografii v ekvilibračním pufru bez DNasy I; dráha 10: eluát po afinitní chromatografii v elučním pufru s přítomnou DNasou I; dráha 11: eluát po afinitní chromatografii v elučním pufru bez DNasy I; dráha 12: výsledný produkt proteinu p53 v jeho „apoformě“ (pro přípravu vzorku použito 10 µl výsledného produktu); dráha 13: výsledný produkt proteinu p53 v jeho „apoformě“ s histidinovou kotvou (pro přípravu vzorku použito 5 µl výsledného produktu).

4.4 Základní charakterizace proteinu p53

Po purifikaci a následném zakoncentrování výsledného preparátu obsahujícího protein p53 byla spektrofotometricky stanovena jeho koncentrace v mikroobjemu. Koncentrace proteinu v získaném roztoku činila $2,6 \text{ mg ml}^{-1}$, což odpovídá molární koncentraci 59 µM , a poměr absorbancí, $A_{260/280}$, byl 1,27.

Na základě výsledku SDS-PAGE byla s pomocí softwaru ImageJ odhadnuta čistota proteinu p53 ve výsledném roztoku. Obsah proteinu p53 v získaném preparátu činí přibližně 20 %.

5 Diskuze

Hemové sensorové proteiny jsou nezbytnou součástí celé řady organismů, kde hrají zásadní roli při regulaci buněčných pochodů. Tím se z těchto proteinů stává zajímavý cíl terapeutického zásahu se záměrem ovlivnit dané klíčové buněčné pochody. Nicméně princip přenosu signálu ze sensorové do funkční domény v současné době zůstává, pro řadu sensorových proteinů, stále neobjasněn. Pro studium tohoto mechanismu se již dlouhodobě využívají modelové bakteriální (prokaryotické) hemové senzory, především z důvodu jejich výrazně jednodušší přípravy [93–95]. Většina doposud známých bakteriálních sensorů ovšem působí jako senzory plynů. V poslední době roste zájem o studium mechanismu přenosu signálu v senzorech hemu, jež se vyskytují především v prostředí eukaryotických organismů. V naší laboratoři již byly dříve izolovány eukaryotické senzory hemu, konkrétně HRI a Bach1. V současné chvíli jsme se rozhodli zaměřit na studium vlastností proteinu p53, který je znám pro celou řadu funkcí a zdaleka ne všechny byly popsány (viz kapitola 1.5.2). Byť byla pozorována schopnost interakce molekuly hemu s proteinem p53 jakožto jedna z možných příčin či komplikací průběhu nádorového bujení, nelze p53 jednoznačně označit za typický hemový sensorový protein. Shen J. *et al.* uvádí potenciální schopnost proteinu p53 působit jako senzor hemu a naším dlouhodobým cílem je toto zjištění ověřit a doplnit dalšími nezbytnými poznatky. Aby bylo možné studovat interakci proteinu p53 s hemem za různých podmínek, je nejprve nezbytné tento protein připravit heterologní expresí. Právě tomuto tématu se věnuje předkládána bakalářská práce.

Plazmid obsahující gen pro protein p53, pLX313-TP53-WT, byl poskytnut laboratořemi Williama Hahna a Davida Roota, USA. Tento plazmid se však primárně využívá k expresi proteinů v savčích buňkách či jako lentivirální vektor a pro účely prokaryotické exprese byl nevhodný. Protože v naší laboratoři máme zkušenosti s expresí rekombinantních eukaryotických proteinů v prokaryotickém expresním systému buněk *E. coli*, byl daný gen převeden do vektoru pET-21c(+), který je pro tento záměr vhodný a navíc naše laboratoř tento přístup často využívá pro heterologní expresi a izolaci proteinů [93–95]. Zdrojem vektoru pET-21c(+) byl plazmid pET-21c(+)/Bach1-Histag poskytnutý Mgr. Jakubem Vávrou [93]. Tento plazmid

mimo jiné obsahuje ve své nukleotidové sekvenci takovou část, která do sekvence exprimovaného proteinu zavede histidinovou kotvu a ta je pak s výhodou využita během izolace (viz dále). Plazmid pET-21c(+)/p53-Histag byl získán v optimální koncentraci i čistotě.

Za účelem amplifikace plazmidu pET-21c(+)/p53-Histag bylo využito kompetentních buněk *E. coli* DH5 α . Samotná exprese proteinu p53-Histag však byla uskutečněna prostřednictvím buněk *E. coli* BL-21(DE3). Volba příslušných komerčně dostupných buněk vycházela ze zkušeností v naší laboratoři a z popisu vlastností daných kmenů buněk. Oba dva druhy buněk byly před zmíněnými procesy transformované plazmidem pET-21c(+), který ve své nukleotidové sekvenci nese gen zajišťující rezistenci vůči antibiotiku ampicilin. Této skutečnosti bylo využito pro potvrzení, že výše zmíněné buňky byly daným plazmidem skutečně transformovány a tím došlo k selektivní kultivaci buněk. Důvodem, proč na kontrolní agarové plotně obsahující ampicilin nebyl pozorován výskyt bakteriálních kolonií, je fakt, že netransformované buňky nedisponovaly rezistencí vůči danému antibiotiku.

Expresi proteinu p53 s histidinovou kotvou byla uskutečněna prostřednictvím prokaryotického organismu *E. coli* BL-21(DE3). Nepřekvapilo nás ovšem, že míra exprese byla, podobně jako v případě jiných eukaryotických proteinů, nižší než míra exprese bakteriálních proteinů. S expresí proteinů v prokaryotickém systému *E. coli* má naše laboratoř bohaté zkušenosti, jedná-li se o expresi bakteriálních (YddV, AfGcHK) [94, 96] nebo eukaryotických proteinů (HRI, Bach1) [93, 95]. Ve všech případech je IPTG vhodným indukčním činidlem, které spolehlivě nastartuje proces exprese rekombinantních proteinů. Porovnáním výsledků SDS elektroforéz jednotlivých buněčných směsí před iniciací exprese pomocí IPTG a po tomto kroku je zřejmé, že v případě bakteriálních proteinů je míra exprese podstatně vyšší než v případě eukaryotických proteinů [93–95]. Také v našem případě exprese proteinu p53 byl tento proces úspěšně iniciován IPTG (viz Obrázek 13 a 14, dráhy 2 a 3), nicméně míra exprese nebyla tak vysoká jako v případě modelových bakteriálních proteinů [93–95]. Co je příčinou nižší míry exprese eukaryotických proteinů v porovnání s modelovými prokaryotickými proteiny? Je možné například uvažovat o míře toxicity rekombinantních eukaryotických proteinů na prokaryotický systém bakterie *E. coli*, ve kterém je daný protein exprimován. O míře toxicity vypovídá především množství

kultivovaných buněk, které exprimují daný protein, jichž je v případě exprese bakteriálních proteinů až dvojnásobné množství než v případě exprese eukaryotických proteinů [93–95].

Na míru exprese rekombinantního proteinu má velký vliv také teplota inkubace [97]. Téměř všechny proteiny připravované v naší laboratoři jsou běžně po exprimování při teplotě 15 °C. Současná literatura však uvádí, že míra exprese proteinu p53 v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) může být výrazným způsobem zvýšena v případě použití vyšších teplot [97]. Dílčím cílem této práce bylo tedy prokázat vliv teploty na míru exprese proteinu p53. Porovnáním analýzy vzorků buněk odebraných před a po indukci exprese proteinu p53 (Obrázek 13 a 14 na stranách 58 a 59, dráhy 2 a 3) je zřejmé, že při teplotě 25 °C byla míra exprese p53 podstatně vyšší než v případě exprese při teplotě 15 °C. O vyšším obsahu exprimovaného rekombinantního proteinu svědčí i vyšší obsah proteinu s molekulovou hmotností kolem 50 kDa v drahách 6 a 7 Obrázků 13 a 14, které obsahují vzorky pelet po ultracentrifugaci. Lze tedy předpokládat, že výrazný podíl proteinu p53 zůstal v tzv. inkluzních tělískách, čemuž můžeme zabránit při dalších izolacích účinnější sonikací. Nemůžeme rovněž vyloučit, že s ještě vyšší teplotou exprese proteinu, se bude v inkluzních tělískách nacházet ještě větší množství proteinu p53 a je možné do budoucna uvažovat o izolaci proteinu p53 přímo z těchto inkluzních tělísek. Vzhledem k tomu, že tento experiment byl proveden jen jednou, bylo by vhodně provést několikanásobné opakování nebo ještě lépe provést větší počet expresí s různou teplotou inkubace (v rozmezí 10 – 37 °C) a následně určit optimální teplotu, při které dochází ke kvantitativně nejprůzračnější expresi p53. Je logické předpokládat, že při vyšší teplotě je protein p53 schopen snáze zaujmout svoji nativní konformaci. Protein p53 působí v lidském organismu při teplotě přibližně 37 °C, při vyšších teplotách byla ovšem zaznamenána destabilizace jeho DNA-vazebné domény, jež podléhá následné denaturaci [62]. Cílem dalších studií je tedy ověřit tento předpoklad a stanovit optimální parametry pro nejefektivnější expresi p53. Rozhodně je ale doporučeno provádět každou další expresi proteinu p53 v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) při teplotě vyšší 15 °C.

Jedním z klíčových kroků izolace proteinu p53 a jeho separace od mnoha dalších balastních proteinů přítomných v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) byla afinitní chromatografie. Naše strategie spočívala v zavedení tzv. histidinové kotvy na konec

sekvence proteinu p53. Při příštím použití této metody však navrhujeme použití dvojnásobného množství afinitního nosiče, neboť po aplikaci ekvilibračního pufru na kolonu s afinitním nosičem, byla velká část proteinu eluována v ekvilibračním pufru (viz Obrázky 13 a 14 na stranách 58 a 59, dráhy 8 a 9), což by mohlo znamenat, že nedošlo k interakci části obsahu proteinu p53 s afinitním nosičem. Nicméně nemůžeme vyloučit ani tu možnost, že afinitního nosiče byl dostatek a jednalo se o jiné proteiny mající shodou okolností stejnou molekulovou hmotnost jako protein p53. Obecně je zavádění histidinové kotvy hojně využívanou strategií, a v daném případě izolace proteinu p53 byl tento přístup úspěšný. Nicméně existují případy, kdy aplikace histidinové kotvy selhala, a bylo potřeba použít jiný přístup. Příkladem může být protein YddV, který bylo možno izolovat až s pomocí kotvy v podobě proteinu vázajícího maltosu [96]. Přesto, že zvolená strategie byla v případě izolace proteinu p53 úspěšná, přece jen se některé dílčí komplikace vyskytly – výsledný preparát proteinu p53 byl kontaminován proteiny s nižší molekulovou hmotností než protein p53 (Obrázky 13 a 14 dráhy finálních preprátů). Při izolaci žádoucího proteinu mohlo dojít ke kontaminaci bakteriálními proteiny o hmotnosti přibližně 25 kDa, které pravděpodobně mají bohaté zastoupení histidinů a jako protein p53 interagovali s afinitním nosičem. Dalším důvodem přítomnosti těchto kontaminantů může být proteolytická degradace proteinu p53. K zamezení možného proteolytického štěpení p53 bylo na počátku jeho izolace využito inhibitorů proteas, avšak možnost proteolýzy nelze zcela vyloučit, jelikož k ní mohlo dojít ještě před započítím samotného izolačního postupu. Další možností, která vysvětluje výše uvedené pozorování, je přítomnost vazebného partnera, jenž s proteinem p53 během izolace interagoval. Mohlo se například jednat o protein s chaperonovou aktivitou. K jednoznačnému určení zda se jedná o produkt degradace p53 nebo neznámý bakteriální protein by bylo potřeba provést další analýzy. K tomuto účelu lze využít sekvenace pomocí hmotnostní spektrometrie a porovnáním zjištěných primárních struktur neznámých proteinů se známou sekvencí p53 by bylo možné vyloučit jeho možnou degradaci. Za předpokladu, že se jedná o bakteriální protein s bohatým zastoupením histidinů ve své struktuře, by takové kontaminaci bylo možno v budoucích izolačních postupech předejít odebráním méně frakcí získaných gelovou permeační chromatografií. Dojde tím sice ke ztrátám na straně výsledného produktu, ale bude izolován o podstatně vyšší čistotě, což vyloučí

potenciální potíže při jeho podrobnější analýze. Tento přístup však nebude účinný, pokud se jedná o interakčního partnera proteinu p53 nebo pokud je důvodem přítomnosti kontaminujících proteinů proteolytické štěpení proteinu p53. Celkový výtěžek izolace p53 je srovnatelný s výtěžky izolací jiných eukaryotických proteinů dříve izolovaných v naší laboratoři (HRI, eIF2 α , Bach1), v porovnání s výtěžky izolací bakteriálních proteinů (YddV, AfGcHK) je však podstatně nižší [93–96].

Protein p53 s histidinovou kotvou má teoretickou molekulovou hmotnost, danou sumou molekulových hmotností jeho aminokyselinových zbytků, odpovídající přibližně 44,7 kDa. Při purifikaci p53 s pomocí gelové permeační chromatografie však docházelo k eluci p53 podstatně dříve než by odpovídalo molekulové hmotnosti monomerního proteinu, Tento závěr můžeme učinit na základě kalibrace použité kolony, která byla provedena dříve [96]. Pokud se budeme v budoucnu věnovat oligomernímu stavu proteinu p53 v přítomnosti i absenci hemu, bude vhodné znovu ověřit již provedenou kalibraci dané kolony. Oligomerní stav proteinu p53 hraje významnou roli v řízení jeho regulační kaskády a v budoucnu se budeme snažit zkoumat vliv přítomnosti hemu nebo jeho absence na oligomerní stav proteinu p53. Bylo popsáno, že se protein p53 typicky v buňce vyskytuje ve formě homotetramerního komplexu navázaného na dvoušroubovici DNA. Je ovšem doloženo, že se tento komplex proteinu p53 váže k dvoušroubovici DNA prostřednictvím známých kanonických sekvencí [63], takové sekvence jsou typické především pro eukaryotické organismy, v nichž je výskyt p53 přirozený. Nicméně, nelze vyloučit pravděpodobnost, že se taková oligonukleotidová sekvence může vyskytovat i v genomu buněk *E. coli* BL-21(DE3). S cílem optimalizace izolačního postupu bylo proto využito aktivity DNasy I, za účelem nespécifického štěpení DNA, která pravděpodobně byla přítomna v buňkách *E. coli*. Některé publikace také popisují reverzibilní agregaci proteinu p53 za vzniku oligomerních komplexů, tento efekt je ale způsobován především v důsledku mutací genu TP53 [98, 99]. Zdá se však, že naše výsledky nenaznačují tomu, že by p53 interagoval s DNA *E. coli*. Kdyby docházelo k interakci proteinu p53 s DNA, tak by byl pozorován vliv přítomnosti DNasy I v jednotlivých izolačních krocích. Přesto musíme připustit, že na Obrázcích 13 a 14, dráhy 10 a 11, je možné zaznamenat vliv DNasy I na izolační postup, tento vliv je však velmi nepatrný a je potřeba další ověření, zda DNasa I přispívá k účinnější izolaci proteinu p53.

Závěrem můžeme shrnout, že se podařilo úspěšně zavést gen pro protein p53 do plazmidu pET-21c(+) a posléze byl tento protein úspěšně exprimován v prostředí prokaryotického organismu *E. coli* BL-21(DE3), z něhož byl také izolován. Dle dosavadních publikací lze předpokládat, že protein p53 patří do skupiny hemových sensorových proteinů, které jsou primárním zájmem výzkumu naší laboratoře [1]. Tato vlastnost však nebyla doposud podrobně studována a počet studií, které se zaměřují na p53 jako na potenciální senzor hemu, je velmi málo. Cílem další práce je jednak ověřit skutečnost, že p53 dokáže působit jako hemový sensorový protein a pokud tomu tak opravdu bude, budeme dále pokračovat ve snaze přispět k pochopení molekulární podstaty interakce hemu a p53.

6 Závěr

Předkládaná bakalářská práce se zabývá studiem hemových sensorových proteinů, konkrétně eukaryotickým proteinem p53, který se zdá být nově identifikovaným hemovým sensorovým proteinem. Stanovené cíle předkládané bakalářské práce byly naplněny, konkrétně bylo dosaženo níže uvedených výsledků:

- Dosavadní výsledky vědeckých studií, které se týkají dané problematiky, jsou shrnuty na stranách 8 až 30.
- Byl úspěšně připraven plazmid pET-21c(+)/p53-Histag v optimální čistotě a koncentraci, vhodný pro expresi proteinu p53 v buňkách *E. coli* BL-21(DE3).
- Protein p53 byl úspěšně exprimován v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) po indukci IPTG. Z 1 l TB média bylo vyprodukováno 4,9 g buněk *E. coli* BL-21(DE3), které exprimovaly daný protein při teplotě 15 °C. Z 1 l TB média bylo vyprodukováno 5,2 g buněk *E. coli* BL-21(DE3), které exprimovaly daný protein při teplotě 25 °C.
- Z celkového množství 40,5 g buněk *E. coli* BL-21(DE3) obsahujících rekombinantní protein p53 byl tento protein úspěšně izolován. Celkový výtěžek proteinu byl 1,3 mg tj. 32 µg z 1 g buněk *E. coli* BL-21(DE3), nebo 163 µg z 1 l TB média.
- Ukázalo se, že teplota 25 °C je vhodnější pro expresi proteinu p53 v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) než teplota 15 °C.
- Přítomnost DNasy I během izolace neměla zásadní vliv na výtěžek izolačního procesu, i když její nepatrný vliv byl zaznamenán a v práci diskutován.
- Zdá se, že protein p53 se vyskytuje v roztoku ve vyšších oligomerních stavech.
- Koncentrace finálního preparátu protein p53 byla 59 µM a čistota byla odhadnuta na 20 %.

Seznam použitých zdrojů

- (1) Shen, J.; Sheng, X.; Chang, Z.; Wu, Q.; Wang, S.; Xuan, Z.; Li, D.; Wu, Y.; Shang, Y.; Kong, X.; Yu, L.; Li, L.; Ruan, K.; Hu, H.; Huang, Y.; Hui, L.; Xie, D.; Wang, F.; Hu, R. Iron Metabolism Regulates p53 Signaling through Direct Heme-p53 Interaction and Modulation of p53 Localization, Stability, and Function. *Cell Rep.* **2014**, *7*, 180–193.
- (2) Li, T.; Bonkovsky, H. L.; Guo, J.-T. Structural Analysis of Heme Proteins: Implications for Design and Prediction. *BMC Struct. Biol.* **2011**, *11*, 13.
- (3) Bonkovsky, H. L.; Guo, J.-T.; Hou, W.; Li, T.; Narang, T.; Thapar, M. Porphyrin and Heme Metabolism and the Porphyrrias. *Compr. Physiol.* **2013**, *3*, 365–401.
- (4) Aylward, N.; Bofinger, N. Possible Origin for Porphin Derivatives in Prebiotic Chemistry—a Computational Study. *Orig. Life Evol. Biosph.* **2005**, *35*, 345–368.
- (5) Fuhrhop, J. Porphyrin Assemblies and Their Scaffolds. *Langmuir* **2014**, *30*, 1–12.
- (6) Kleingardner, J. G.; Levin, B. D.; Zoppellaro, G.; Andersson, K. K.; Elliott, S. J.; Bren, K. L. Influence of Heme c Attachment on Heme Conformation and Potential. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2018**, *23*, 1073–1083.
- (7) Hederstedt, L. Heme A Biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1817*, 920–927.
- (8) Donegan, R. K.; Moore, C. M.; Hanna, D. A.; Reddi, A. R. Handling Heme: The Mechanisms Underlying the Movement of Heme within and between Cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *133*, 88–100.
- (9) Hanna, D. A.; Martinez-Guzman, O.; Reddi, A. R. Heme Gazing: Illuminating Eukaryotic Heme Trafficking, Dynamics, and Signaling with Fluorescent Heme Sensors. *Biochemistry* **2017**, *56*, 1815–1823.
- (10) Gell, D. A. Structure and Function of Haemoglobins. *Blood Cells Mol. Dis.* **2018**, *70*, 13–42.

- (11) Farhana, A.; Saini, V.; Kumar, A.; Lancaster, J. R.; Steyn, A. J. C. Environmental Heme-Based Sensor Proteins: Implications for Understanding Bacterial Pathogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* **2012**, *17*, 1232–1245.
- (12) Spiro, T. G.; Jarzecki, A. A. Heme-Based Sensors: Theoretical Modeling of Heme-Ligand-Protein Interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 715–723.
- (13) Ronda, L.; Bruno, S.; Faggiano, S.; Bettati, S.; Mozzarelli, A. Oxygen Binding to Heme Proteins in Solution, Encapsulated in Silica Gels, and in the Crystalline State. *Meth. Enzymol.* **2008**, *437*, 311–328.
- (14) Ramasarma, T.; Vaigundan, D. Alternative Pathway Linked by Hydrogen Bonds Connects Heme-Fe of Cytochrome *c* with Subunit II-CuA of Cytochrome *a*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *505*, 445–447.
- (15) Szilagyi, J. T.; Mishin, V.; Heck, D. E.; Jan, Y.-H.; Aleksunes, L. M.; Richardson, J. R.; Heindel, N. D.; Laskin, D. L.; Laskin, J. D. Selective Targeting of Heme Protein in Cytochrome P450 and Nitric Oxide Synthase by Diphenyleneiodonium. *Toxicol. Sci.* **2016**, *151*, 150–159.
- (16) Vlasova, I. I. Peroxidase Activity of Human Hemoproteins: Keeping the Fire under Control. *Molecules* **2018**, *23*.
- (17) Girvan, H. M.; Munro, A. W. Heme Sensor Proteins. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 13194–13203.
- (18) Shimizu, T.; Lengalova, A.; Martínek, V.; Martínková, M. Heme: Emergent Roles of Heme in Signal Transduction, Functional Regulation and as Catalytic Centres. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 5624–5657.
- (19) Sousa, E. H. S.; Lopes, L. G. d. F.; Gonzalez, G.; Gilles-Gonzalez, M.-A. Drug Discovery Targeting Heme-Based Sensors and Their Coupled Activities. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *167*, 12–20.
- (20) Liebl, U.; Lambry, J.-C.; Vos, M. H. Primary Processes in Heme-Based Sensor Proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1834*, 1684–1692.
- (21) Igarashi, J.; Kitanishi, K.; Martinkova, M.; Murase, M.; Iizuka, A.; Shimizu, T. The Roles of Thiolate-Heme Proteins, Other Than the P450 Cytochromes, in the Regulation of Heme-Sensor Proteins. *Acta Chim. Slov.* **2007**, *55*, 67–74.

- (22) Shimizu, T.; Huang, D.; Yan, F.; Stranava, M.; Bartosova, M.; Fojtíková, V.; Martínková, M. Gaseous O₂, NO, and CO in Signal Transduction: Structure and Function Relationships of Heme-Based Gas Sensors and Heme-Redox Sensors. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 6491–6533.
- (23) Fonseca, B. M.; Paquete, C. M.; Louro, R. O. Molecular Mechanisms of Heme Based Sensors from Sediment Organisms Capable of Extracellular Electron Transfer. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *133*, 104–109.
- (24) Moskvina, O. V.; Kaplan, S.; Gilles-Gonzalez, M.-A.; Gomelsky, M. Novel Heme-Based Oxygen Sensor with a Revealing Evolutionary History. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28740–28748.
- (25) Martínková, M.; Kitanishi, K.; Shimizu, T. Heme-Based Globin-Coupled Oxygen Sensors: Linking Oxygen Binding to Functional Regulation of Diguanilate Cyclase, Histidine Kinase, and Methyl-Accepting Chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 27702–27711.
- (26) Gong, W.; Hao, B.; Mansy, S. S.; Gonzalez, G.; Gilles-Gonzalez, M. A.; Chan, M. K. Structure of a Biological Oxygen Sensor: A New Mechanism for Heme-Driven Signal Transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 15177.
- (27) Henry, J. T.; Crosson, S. Ligand-Binding PAS Domains in a Genomic, Cellular, and Structural Context. *Annu. Rev. Microbiol.* **2011**, *65*, 261–286.
- (28) Sasakura, Y.; Yoshimura-Suzuki, T.; Kurokawa, H.; Shimizu, T. Structure-Function Relationships of *EcDOS*, a Heme-Regulated Phosphodiesterase from *Escherichia Coli*. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 37–43.
- (29) Ascenzi, P.; Bocedi, A.; Leoni, L.; Visca, P.; Zennaro, E.; Milani, M.; Bolognesi, M. CO Sniffing through Heme-Based Sensor Proteins. *IUBMB Life* **2004**, *56*, 309–315.
- (30) Walker, J. A.; Rivera, S.; Weinert, E. E. Mechanism and Role of Globin-Coupled Sensor Signalling. *Adv. Microb. Physiol.* **2017**, *71*, 133–169.
- (31) Anzenbacher, P.; Marchal, S.; Palacký, J.; Anzenbacherová, E.; Domaschke, T.; Lange, R.; Shimizu, T.; Kitanishi, K.; Stranava, M.; Stiborová, M.; Martinkova, M. Pressure Effects Reveal That Changes in the Redox States of the Heme

- Iron Complexes in the Sensor Domains of Two Heme-Based Oxygen Sensor Proteins, *EcDOS* and *YddV*, Have Profound Effects on Their Flexibility. *FEBS J.* **2014**, *281*, 5208–5219.
- (32) Itoh, T.; Matsuura, S.-I.; Chuong, T. T.; Tanaike, O.; Hamakawa, S.; Shimizu, T. Successful Mesoporous Silica Encapsulation of Optimally Functional *EcDOS* (*E. Coli* Direct Oxygen Sensor), a Heme-Based O₂-Sensing Phosphodiesterase. *Anal. Sci.* **2019**, *35*, 329–335.
- (33) Puranik, M.; Weeks, C. L.; Lahaye, D.; Kabil, O.; Taoka, S.; Nielsen, S. B. n.; Groves, J. T.; Banerjee, R.; Spiro, T. G. Dynamics of Carbon Monoxide Binding to Cystathionine Beta-Synthase. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 13433–13438.
- (34) Bublil, E. M.; Majtan, T. Classical Homocystinuria: From Cystathionine Beta-Synthase Deficiency to Novel Enzyme Therapies. *Biochimie* **2019**, *173*, 48–56.
- (35) Sandner, P.; Zimmer, D. P.; Milne, G. T.; Follmann, M.; Hobbs, A.; Stasch, J.-P. Soluble Guanylate Cyclase Stimulators and Activators. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2019**.
- (36) Montfort, W. R.; Wales, J. A.; Weichsel, A. Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor. *Antioxid. Redox Signal.* **2017**, *26*, 107–121.
- (37) Igarashi, J.; Kitanishi, K.; Shimizu, T. Emerging Roles of Heme as a Signal and a Gas-Sensing Site: Heme-Sensing and Gas-Sensing Proteins. *Handbook of Porphyrin Science* **2011**, *15*, 399–460.
- (38) Igarashi, J.; Murase, M.; Iizuka, A.; Pichierri, F.; Martinkova, M.; Shimizu, T. Elucidation of the Heme Binding Site of Heme-Regulated Eukaryotic Initiation Factor 2alpha Kinase and the Role of the Regulatory Motif in Heme Sensing by Spectroscopic and Catalytic Studies of Mutant Proteins. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 18782–18791.
- (39) Burwick, N.; Aktas, B. H. The eIF2-Alpha Kinase HRI: A Potential Target beyond the Red Blood Cell. *Expert Opin. Ther. Targets* **2017**, *21*, 1171–1177.

- (40) Wek, R. C.; Jiang, H.-Y.; Anthony, T. G. Coping with Stress: eIF2 Kinases and Translational Control. *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34*, 7–11.
- (41) Zhang, S.; Macias-Garcia, A.; Velazquez, J.; Paltrinieri, E.; Kaufman, R.; Chen, J.-J. HRI Coordinates Translation by eIF2 α P and mTORC1 to Mitigate Ineffective Erythropoiesis in Mice during Iron Deficiency. *Blood* **2017**, *131*, 450–461.
- (42) Segawa, K.; Watanabe-Matsui, M.; Tsuda, K.; Matsui, T.; Shirouzu, M.; Igarashi, K.; Murayama, K. Biophysical Characterization of Heme Binding to the Intrinsically Disordered Region of Bach1. *Eur. Biophys. J.* **2019**, *48*, 361–369.
- (43) Davudian, S.; Mansoori, B.; Shajari, N.; Mohammadi, A.; Baradaran, B. BACH1, the Master Regulator Gene: A Novel Candidate Target for Cancer Therapy. *Gene* **2016**, *588*, 30–37.
- (44) Zhang, X.; Guo, J.; Wei, X.; Niu, C.; Jia, M.; Li, Q.; Meng, D. Bach1: Function, Regulation, and Involvement in Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 1–8.
- (45) Segawa, K.; Watanabe-Matsui, M.; Matsui, T.; Igarashi, K.; Murayama, K. Functional Heme Binding to the Intrinsically Disordered C-Terminal Region of Bach1, a Transcriptional Repressor. *Tohoku J. Exp. Med.* **2019**, *247*, 153–159.
- (46) Kaspar, J. W.; Jaiswal, A. K. Antioxidant-Induced Phosphorylation of Tyrosine 486 Leads to Rapid Nuclear Export of Bach1 That Allows Nrf2 to Bind to the Antioxidant Response Element and Activate Defensive Gene Expression. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 153–162.
- (47) Wang, X.; Liu, J.; Jiang, L.; Wei, X.; Niu, C.; Wang, R.; Zhang, J.; Meng, D.; Yao, K. Bach1 Induces Endothelial Cell Apoptosis and Cell-Cycle Arrest through ROS Generation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 1–13.
- (48) Welsh, D. K.; Takahashi, J. S.; Kay, S. A. Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. *Annu. Rev. Physiol.* **2010**, *72*, 551–577.
- (49) Ozburn, A. R.; Kern, J.; Parekh, P. K.; Logan, R. W.; Liu, Z.; Falcon, E.; Becker-Krail, D.; Purohit, K.; Edgar, N. M.; Huang, Y.; McClung, C. A. NPAS2 Regulation of Anxiety-Like Behavior and GABAA Receptors. *Front. Mol. Neurosci.* **2017**, *10*, 360.

- (50) Lane, D. P.; Crawford, L. V. T Antigen Is Bound to a Host Protein in SV40-Transformed Cells. *Nature* **1979**, *278*, 261–263.
- (51) Levine, A. J.; Oren, M. The First 30 Years of p53 : Growing Ever More Complex. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 749–758.
- (52) Soussi, T. The History of p53 . A Perfect Example of the Drawbacks of Scientific Paradigms. *EMBO Rep.* **2010**, *11*, 822–826.
- (53) Stiewe, T. The p53 Family in Differentiation and Tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 165–168.
- (54) Sullivan, K. D.; Galbraith, M. D.; Andrysik, Z.; Espinosa, J. M. Mechanisms of Transcriptional Regulation by p53. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 133–143.
- (55) Walker, K. K.; Levine, A. J. Identification of a Novel p53 Functional Domain That Is Necessary for Efficient Growth Suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 15335–15340.
- (56) Gohari, M.; Neámatzadeh, H.; Jafari, M. A.; Mazaheri, M.; Zare-Shehneh, M.; Abbasi-Shavazi, E. Association between the p53 Codon 72 Polymorphism and Primary Open-Angle Glaucoma Risk: Meta-Analysis Based on 11 Case-Control Studies. *Indian J. Ophthalmol.* **2016**, *64*, 756–761.
- (57) Chen, F.-M.; Ou-Yang, F.; Yang, S.-F.; Tsai, E.-M.; Hou, M.-F. p53 Codon 72 Polymorphism in Taiwanese Breast Cancer Patients. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **2013**, *29*, 259–264.
- (58) Katkoori, V. R.; Manne, U.; Chaturvedi, L. S.; Basson, M. D.; Haan, P.; Coffey, D.; Bumpers, H. L. Functional Consequence of the p53 Codon 72 Polymorphism in Colorectal Cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 76574–76586.
- (59) Uversky, V. N. p53 Proteoforms and Intrinsic Disorder: An Illustration of the Protein Structure-Function Continuum Concept. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1874.
- (60) Kitayner, M.; Rozenberg, H.; Kessler, N.; Rabinovich, D.; Shaulov, L.; Haran, T. E.; Shakked, Z. Structural Basis of DNA Recognition by p53 Tetramers. *Mol. Cell* **2006**, *22*, 741–753.

- (61) Tan, Y. S.; Mhoumadi, Y.; Verma, C. S. Roles of Computational Modelling in Understanding p53 Structure, Biology, and Its Therapeutic Targeting. *J. Mol. Cell Biol.* **2019**, *11*, 306–316.
- (62) Joerger, A. C.; Fersht, A. R. Structure-Function-Rescue: The Diverse Nature of Common p53 Cancer Mutants. *Oncogene* **2007**, *26*, 2226–2242.
- (63) Brázda, V.; Coufal, J. Recognition of Local DNA Structures by p53 Protein. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 375.
- (64) Fadda, E.; Nixon, M. G. The Transient Manifold Structure of the p53 Extreme C-Terminal Domain: Insight into Disorder, Recognition, and Binding Promiscuity by Molecular Dynamics Simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 21287–21296.
- (65) Brázda, V.; Fojta, M. The Rich World of p53 DNA Binding Targets: The Role of DNA Structure. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5605.
- (66) Joerger, A. C.; Fersht, A. R. The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. *Annu. Rev. Biochem.* **2016**, *85*, 375–404.
- (67) Vieler, M.; Sanyal, S. p53 Isoforms and Their Implications in Cancer. *Cancers (Basel)* **2018**, *10*, 288.
- (68) Khoury, M. P.; Bourdon, J.-C. p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor? *Genes Cancer* **2011**, *2*, 453–465.
- (69) Fischer, M. Census and Evaluation of p53 Target Genes. *Oncogene* **2017**, *36*, 3943–3956.
- (70) Reed, J. C. The Survivin Saga Goes *in vivo*. *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 965–969.
- (71) Maximov, G.; Maximov, K. The Role of p53 Tumor-Suppressor Protein in Apoptosis and Cancerogenesis. *Biotechnol. Biotec. Eq.* **2008**, *22*, 664–668.
- (72) Haupt, S.; Berger, M.; Goldberg, Z.; Haupt, Y. Apoptosis - the p53 Network. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 4077–4085.

- (73) Nahacka, Z.; Svadlenka, J.; Peterka, M.; Ksandrova, M.; Benesova, S.; Neuzil, J.; Andera, L. TRAIL Induces Apoptosis but Not Necroptosis in Colorectal and Pancreatic Cancer Cells Preferentially via the TRAIL-R2/DR5 Receptor. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* **2018**, *1865*, 522–531.
- (74) Engeland, K. Cell Cycle Arrest through Indirect Transcriptional Repression by p53 : I Have a DREAM. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 114–132.
- (75) Georgakilas, A. G.; Martin, O. A.; Bonner, W. M. p21 : A Two-Faced Genome Guardian. *Trends Mol. Med.* **2017**, *23*, 310–319.
- (76) Wanka, C.; Steinbach, J. P.; Rieger, J. Tp53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) Protects Glioma Cells from Starvation-Induced Cell Death by up-Regulating Respiration and Improving Cellular Redox Homeostasis. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 33436–33446.
- (77) Bensaad, K.; Tsuruta, A.; Selak, M. A.; Vidal, M. N. C.; Nakano, K.; Bartrons, R.; Gottlieb, E.; Vousden, K. H. TIGAR, a p53 -Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. *Cell* **2006**, *126*, 107–120.
- (78) Shan, B.; Li, D.-W.; Brüschweiler-Li, L.; Brüschweiler, R. Competitive Binding between Dynamic p53 Transactivation Subdomains to Human MDM2 Protein: Implications for Regulating the p53 ·MDM2/MDMX Interaction. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 30376–30384.
- (79) Nag, S.; Qin, J.; Srivenugopal, K. S.; Wang, M.; Zhang, R. The MDM2-p53 Pathway Revisited. *J. Biomed. Res.* **2013**, *27*, 254–271.
- (80) Kasthuber, E. R.; Lowe, S. W. Putting p53 in Context. *Cell* **2017**, *170*, 1062–1078.
- (81) Ingaramo, M. C.; Sánchez, J. A.; Dekanty, A. Regulation and Function of p53 : A Perspective from *Drosophila* Studies. *Mechanisms of Development* **2018**, *154*, 82–90.
- (82) Katsarou, M.-S.; Papasavva, M.; Latsi, R.; Drakoulis, N. Hemochromatosis: Hereditary Hemochromatosis and HFE Gene. *Vitam. Horm.* **2019**, *110*, 201–222.

- (83) Salgia, R. J.; Brown, K. Diagnosis and Management of Hereditary Hemochromatosis. *Clin. Liver Dis.* **2015**, *19*, 187–198.
- (84) Farinelli, S. E.; Greene, L. A. Cell Cycle Blockers Mimosine, Ciclopirox, and Deferoxamine Prevent the Death of PC12 Cells and Postmitotic Sympathetic Neurons after Removal of Trophic Support. *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 1150–1162.
- (85) Shen, J.; Sheng, X.; Chang, Z.; Wu, Q.; Xie, D.; Wang, F.; Hu, R. The Heme-p53 Interaction: Linking Iron Metabolism to p53 Signaling and Tumorigenesis. *Mol. Cell. Oncol.* **2016**, *3*, 1–3.
- (86) Zhang, K.; Fan, Z.; Weng, J.; Zhao, J.; Wang, J.; Wu, H.; Xie, M.; Zhou, H.; Li, H. Peptide-Based Biosensing of Redox-Active Protein–Heme Complexes Indicates Novel Mechanism for Tumor Survival under Oxidative Stress. *ACS Sens.* **2019**, *4*, 2671–2678.
- (87) Gotoh, T.; Vila-Caballer, M.; Liu, J.; Schiffhauer, S.; Finkielstein, C. V. Association of the Circadian Factor Period 2 to p53 Influences p53 's Function in DNA-Damage Signaling. *Mol. Biol. Cell* **2015**, *26*, 359–372.
- (88) Gotoh, T.; Vila-Caballer, M.; Santos, C. S.; Liu, J.; Yang, J.; Finkielstein, C. V. The Circadian Factor Period 2 Modulates p53 Stability and Transcriptional Activity in Unstressed Cells. *Mol. Biol. Cell* **2014**, *25*, 3081–3093.
- (89) Nishizawa, H.; Ota, K.; Dohi, Y.; Ikura, T.; Igarashi, K. Bach1-Mediated Suppression of p53 Is Inhibited by p19 (ARF) Independently of MDM2. *Cancer Sci.* **2012**, *103*, 897–903.
- (90) Giacomelli, A. O.; Yang, X.; Lintner, R. E.; McFarland, J. M.; Duby, M.; Kim, J.; Howard, T. P.; Takeda, D. Y.; Ly, S. H.; Kim, E.; Gannon, H. S.; Hurhula, B.; Sharpe, T.; Goodale, A.; Fritchman, B.; Steelman, S.; Vazquez, F.; Tsherniak, A.; Aguirre, A. J.; Doench, J. G.; Piccioni, F.; Roberts, C. W. M.; Meyerson, M.; Getz, G.; Johannessen, C. M.; Root, D. E.; Hahn, W. C. Mutational Processes Shape the Landscape of TP53 Mutations in Human Cancer. *Nat. Genet.* **2018**, *50*, 1381–1387.
- (91) The UniProt Consortium UniProt: A Worldwide Hub of Protein Knowledge. *Nucleic Acids Research* **2018**, *47*, D506–D515.

- (92) Forget, K. J.; Tremblay, G.; Roucou, X. p53 Aggregates Penetrate Cells and Induce the Co-Aggregation of Intracellular p53 . *PLoS One* **2013**, *8*, 69242.
- (93) Vávra, J. Příprava plazmidu, exprese, izolace a charakterizace hemového sensorového proteinu Bach1., Bakalářská práce, Praha: Univerzita Karlova, 2017.
- (94) Fojtíková, V. Důležité role hemu: signál pro hem-detekující proteiny a detekční místo v plyn-detekujících proteinech., Bakalářská práce, Praha: Univerzita Karlova, 2012.
- (95) Fojtík, L. Charakterizace vybraných vlastností modelových zástupců hemových sensorových proteinů., Bakalářská práce, Praha: Univerzita Karlova, 2018.
- (96) Lengalova, A.; Fojtikova-Proskova, V.; Vavra, J.; Martínek, V.; Stranava, M.; Shimizu, T.; Martinkova, M. Kinetic Analysis of a Globin-Coupled Diguanilate Cyclase, YddV: Effects of Heme Iron Redox State, Axial Ligands, and Heme Distal Mutations on Catalysis. *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *201*, 110833.
- (97) Wang, L.; Zhao, T.; Wang, S.; Jin, J.; Cai, Y.; Wang, F. Expression, Purification, and *in vitro* Mitochondrial Interaction Analysis of Full-Length and Truncated Human Tumor Suppressor p53 . *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2019**, *83*, 1220–1226.
- (98) Safari, M. S.; Wang, Z.; Tailor, K.; Kolomeisky, A. B.; Conrad, J. C.; Vekilov, P. G. Anomalous Dense Liquid Condensates Host the Nucleation of Tumor Suppressor p53 Fibrils. *iScience* **2019**, *12*, 342–355.
- (99) Yang, D. S.; Saeedi, A.; Davtyan, A.; Fathi, M.; Safari, M. S.; Klindziuk, A.; Barton, M. C.; Varadarajan, N.; Kolomeisky, A. B.; Vekilov, P. G. Mesoscopic Liquid Clusters Represent a Distinct Condensate of Mutant p53. *bioRxiv* **2020**.

